

Aus der Klinik für Urologie und Kinderurologie
Geschäftsführender Direktor: Univ.- Prof. Dr. R. Hofmann
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Immunologische Wirkung einer Therapie mit immunstimulativer DNA
(CpG-ODN) im subkutanen, murinen Harnblasenkarzinommodell unter
Verwendung einer Toll-like-Rezeptor-9-Knock-out-Maus**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten
Humanmedizin dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Julia Christina Salimi (geb. Scholl)
aus Kassel

Marburg, 2020

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
25.11.2020.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan i.V. der Prodekan: Herr Prof. Dr. R. Müller

Referent: Herr Prof. Dr. A. Hegele

1. Koreferent: Herr Prof. Dr. U. Koehler

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungs- und Abbildungsverzeichnis	1
	Abkürzungsverzeichnis	1
	Abbildungsverzeichnis	4
2	Einleitung	5
	2.1 Einführung	5
	2.2 Das Harnblasenkarzinom	6
	2.2.1 Epidemiologie und Inzidenz	6
	2.2.2 Ätiologie	7
	2.2.3 Pathogenese	9
	2.2.4 Klassifikation	11
	2.2.5 Klinik	15
	2.2.6 Diagnostik	15
	2.2.7 Therapie	18
	2.2.8 Nachsorge und Prognose	25
	2.3. Immunologische Grundlagen	25
	2.3.1 Das Immunsystem	25
	2.3.1.1. Das unspezifische Immunsystem	26
	2.3.1.2. Das adaptive Immunsystem	28
	2.3.1.3. Die Bedeutung der Zytokine	30
	2.3.1.4. Tumorspezifischer Wirkmechanismus des Immunsystems	32
	2.3.2. Immunstimulative Tumorthherapie	33
	2.3.2.1. BCG – Entwicklung und Wirkmechanismus	33
	2.3.2.2. CpG-ODN	34
	2.4. Fragestellung	40
3	Material und Methoden	42
	3.1 Zelllinie	42
	3.2 Zellkultur	42
	3.2.1 Medium- und Zellaufbereitung	43
	3.2.2. Mediumwechsel und Zellpassage	44

3.2.3. Zellzählung	44
3.2.4. Zellaufbewahrung	45
3.3 Tiermodell	45
3.3.1. Tiere	45
3.3.2. Anästhesie	46
3.3.3. Tumorzellinstillation	47
3.3.4. Versuchsaufbau	47
3.3.5. Sektion	49
3.3.6. Probenaufbewahrung	49
3.4 Experimentelle Methodik und Durchführung	50
3.4.1. RNA-Extraktion	50
3.4.2 Reverse Transkriptions - Polymerase Kettenreaktion (RT- PCR) .	52
3.4.2 Qualitative PCR	54
3.4.5 Gelelektrophorese	57
3.4.6 Real-Time-PCR	58
3.5 Auswertung	63
3.5.1 Klinische Daten	63
3.5.2 Ergebnisse der Real-Time-PCR	63
4 Ergebnisse	69
4.1. Klinische Aspekte	69
4.1.1. Vitalitätsverlauf	70
4.1.2. Gewichtsverlauf	71
4.1.3 Tag der ersten Tumorpalpation	73
4.1.4 Tumorgröße post sectionem	73
4.1.5. Zusammenfassung der klinischen Daten	74
4.2. Experimentelle Ergebnisse	75
4.2.1. Ergebnisse der Real-Time-PCR	76
4.2.2. Expressionsfaktoren der Zielgene	78
4.2.2.1. $\Delta C(t)$ -, $\Delta\Delta-C(t)$ - und $2^{-\Delta\Delta-C(t)}$ –Wert der C57BL/6-Mausspezies ..	79
4.2.2.2. $\Delta C(t)$ -, $\Delta\Delta-C(t)$ - und $2^{-\Delta\Delta-C(t)}$ –Wert der C57BL/6-TLR-9-Knock-out-Mausspezies	82
4.2.3. Ergebnisse des Tumorgewebes (gesamt)	86

	4.2.3.1. Zytokinexpressionsfaktoren	86
	4.2.4. Ergebnisse der Tumoren rechts.....	90
	4.2.5. Ergebnisse der Tumoren links	94
	4.2.6 Vergleich der lokalen und systemischen Wirkung der CpG- Oligonukleotide	97
5	Diskussion	101
6	Zusammenfassung	113
7	Literaturverzeichnis.....	117
8	Anhang	147
	Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	147
	Danksagung	148

1 Abkürzungs- und Abbildungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
APZ	antigenpräsentierende Zellen
BAK	BCG-aktivierte-Killerzelle
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
C	Cytosin
C/G	Cisplatin/Gemcitabin
C(t)-Wert	Threshold- Cycle
CA	Karzinom
cDNA	complementary-Desoxyribonucleoid acid
Cis	Carcinoma in situ
CpG-ODN	Cytosin-Guanin reiche Oligodeoxynukleotide
DC/DCs	dendritische Zelle(n)
Diag.	Diagramm
DNA	Desoxyribonucleoid acid
DNS	Desoxyribonuklein Säure
EAU	European Association of Urology
Eff.	Effizienz
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HD-MVAC	Hochdosis Methotrexat, Vinblastin, Doxorubicin und Cisplatin
HKG	Housekeeping Gen

Abkürzungs- und Abbildungsverzeichnis

ICAM	interzelluläre Adhäsionsmoleküle (intercellular adhesion molecule)
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IRAK	Interleukin-1 receptor activated kinase
KG	Körpergewicht
LPS	Lipopolysaccharid
MHC	major histocompatibility complex
MHPRT	Mouse Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
MW	Mittelwert
MyD88	Myeloid marker 88
MVAC	Methotrexat, Vinblastin, Doxorubicin und Cisplatin
NF- κ B	nuclear factor κ B
NK	Natürliche Killerzelle(n)
NTC	no template control
ODN	Oligodeoxynukleotide
PAMPs	pathogen assoziierte molekulare Muster (pathogen associated moleculars patterns)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDC	plasmacytotische dendritische Zelle(n)
PRR	Muster erkennender Rezeptor (pattern recognition receptors)
Real-Time-PCR	Real-Time Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleid acid)
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR

Abkürzungs- und Abbildungsverzeichnis

Sog.	Sogenannte
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Tbc	Tuberkulose
TCR	T-Zell-Rezeptor (T-cell receptor)
TGF	Transforming Growth Factor
Th- Zelle	T-Helfer-Zelle
TLR	Toll-like receptor
Tm	Schmelztemperatur
TRAF6	tumor necrosis factor receptor-associated factor 6
TUR-B	transurethrale Resektion der Blase
Vgl.	Vergleich
WHO	World Health Organisation

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zystoskopische Darstellung eines exophytischen Tumors (aus: Hegele, 2005), Seite 10

Abbildung 2: TNM-Klassifikation (eigen erstellte Grafik), Seite 12

Abbildung.3: Weißlichtendoskopie versus Fluoreszenzendoskopie (aus www.urologe-neustandt.de), Seite 16

Abbildung 4: Interaktion zwischen den beiden Armen des Immunsystems (modifiziert nach Krieg, 2003), Seite 31

Abbildung 5: Kawai T, Akira S: TLR signalling. Cell Death and Differentiation (2006) 13, 816–825. doi:10.1038/sj.cdd.4401850; published online 20 January 2006, Seite 37

Abbildung 6: Anästhesie über intraperitoneale Injektion des Ketamin-Xylazin-Gemisches (eigenes Bildmaterial), Seite 47

Abbildung 7: Tumorentnahme (eigenes Bildmaterial), Seite 49

Abbildung 8: Originalabbildung des AppliedBiosystems Systems, Seite 59

Abbildung 9: Melting-curve-Darstellung eines Real-Time-PCR-Laufes, Seite 60

2 Einleitung

2.1 Einführung

Das Harnblasenkarzinom ist der häufigste maligne Tumor des Harntraktes, der in einem Verhältnis von 3,4:1 weitaus mehr Männer als Frauen betrifft. Bei den urologischen Tumoren nimmt es nach dem Prostatakarzinom den zweiten Platz ein und stellt insgesamt 3% aller malignen Tumorerkrankungen dar (Scheller et al., 2018; Jocham, 2007).

Derzeit verfügbare Prognoseparameter konzentrieren sich im Wesentlichen auf den histologischen Typ, den Differenzierungsgrad und das Tumorstadium. Als Ursache für die häufige Metastasierung und den damit meist letalen Verlauf dieser Erkrankung sieht man die reiche Versorgung der Muskelschicht mit Blut- und Lymphgefäßen an (Janeway, 2008).

Im Rahmen der Therapie haben sich vor allem operative Maßnahmen wie die transurethrale Blasentumorresektion (TUR-B) und bei Karzinomen der Klassifikation Ta, T1 und dem Carcinoma in situ (Tcis) eine sich anschließende Blaseninstillationstherapie mit Chemotherapeutika oder dem immunmodulativ wirksamen Bacillus Calmette-Guérin (BCG) - attenuierte Tuberkuloseerreger - etabliert (Amling, 2001). Bereits im Jahre 1979 sind von Morales und Mitarbeitern erste Erfolge bei der Instillation mit BCG beschrieben (Morales et al., 1976). Die adjuvante Instillationstherapie konnte die Rezidivrate oberflächlicher Tumoren signifikant senken. Allerdings bleibt unklar, ob BCG auch die Progressionsrate des Wachstums senkt (Sylvester et al., 2004; Malmstrom et al., 2009).

Neben der Therapie mit BCG, das in der Blase durch einen noch nicht bekannten Wirkungsmechanismus eine lokale Immunreaktion hervorruft, hat man bei immunstimulativen Oligonukleotiden ebenfalls die Induktion einer Immunreaktion festgestellt. Verantwortlich wird hierfür die Bindung an unmethylierte CpG-Motive gemacht, die eine vor allem TH-1-gewichtete Reaktion im Zielgewebe hervorrufen. Um die bei der Instillation mit BCG häufig auftretenden

Nebenwirkungen zu minimieren ist es wichtig, neue Therapieansätze mit ähnlicher Wirkung weiter zu erforschen (DeBoer et al., 2003; McAveney et al., 1994; Brandau et al., 2007).

Einleitend sollen die Grundlagen des Harnblasenkarzinoms und immunologische Wirkungsmuster bei Tumorerkrankungen und deren therapeutischer Einsatz am Beispiel des CpG, das wir in unserer Arbeitsgruppe einsetzen, erläutert werden.

2.2 Das Harnblasenkarzinom

2.2.1 Epidemiologie und Inzidenz

Allein in Deutschland wird jährlich bei über 25.000 Menschen die Diagnose des Harnblasenkarzinoms gestellt. Weltweit sind es 260.000 Erkrankte pro Jahr. Das an 5. Stelle der Tumorneuerkrankungen platzierte Harnblasenkarzinom betrifft das männliche Geschlecht mehr als dreifach so häufig wie das Weibliche.

Insgesamt stellt dieses Karzinom 3% aller malignen Tumoren dar. Beim Mann ist es die vierthäufigste bei der Frau die zehnthäufigste maligne Tumorerkrankung. Nach dem Prostatakarzinom ist es als zweithäufigste Tumorerkrankung des Urogenitaltraktes beschrieben (Scheller et al., 2018; Rübben, 2007).

Für das Jahr 2015 publizierte Daten des Robert-Koch-Institutes zeigen für das Jahr 2012 altersstandardisierte Inzidenzen in Deutschland von 18,4/100.000 für Männer und 4,9/100.000 für Frauen. Der jährliche Inzidenzanstieg wird unter anderem auf den steigenden Tabakkonsum zurückgeführt. Das Harnblasenkarzinom stellt nach Lungenkrebs die zweithäufigste Raucherbedingte Krebserkrankung dar.

Das mittlere Lebensalter bei der Erstdiagnose ist zwischen 65 und 75 Jahren. Unter dem 45. Lebensjahr liegt die Erkrankungshäufigkeit bei nur 1%. Neben Alter und Geschlecht spielen auch Hautfarbe und geographische Herkunft eine

Rolle. So wurde ein gehäuftes Auftreten bei hellhäutigen, in Industrieländern lebenden Menschen festgestellt (Robert-Koch Institut, 2015; Golka et al., 2007). Bei Männern beträgt der Anteil der Todesursache Harnblasenkarzinom an allen Krebstodesfällen etwa 3-4%, bei Frauen 2%. Die beobachtete relative Fünfjahresüberlebensrate, die stark mit der Pathologie des vorliegenden Karzinoms und den damit verbundenen Therapieoptionen korreliert, liegt für Männer bei 58% und für Frauen bei 48% (Robert-Koch-Institut, 2015).

2.2.2 Ätiologie

Die Ätiologie des Harnblasenkarzinoms ist nicht vollständig geklärt. Man geht von einem multifaktoriellen Geschehen aus. Verschiedene Risikofaktoren und Noxen konnten identifiziert werden.

So wurde bereits im Jahre 1895 durch eine Studie des Chirurgen Ludwig Rehn bekannt, dass das Blasenkarzinom zu den Tumorentitäten gehört, dessen Entstehung primär durch schädigende Umweltfaktoren ausgelöst wird (Lehmann et al., 2005).

Die vor allem in der Gummi-, Aluminium-, Textil- und Druckindustrie freigesetzten aromatischen Amine, zu denen β -Naphthylamin, Benzidin sowie 4-Amino-Diphenyl zählen, sind gemeinsam mit Tryptophan-Metaboliten, die beim Rauchen entstehen, Hauptursache bei der Entstehung des Harnblasenkarzinoms (Jocham, 2007). Kanzerogen wirken diese Stoffe auf folgenden Wegen:

Die aromatischen Amine werden durch 2 Acetyltransferasen (NAT1 und NAT2) acetyliert. Diese befinden sich vor allem in der Leber (NAT2) und auch im Harnblasenübergangsepithel (NAT1). Man unterscheidet Langsam- von Schnellacetylierern, deren Geschwindigkeit vor allem beim Harnblasenkarzinom Einfluss auf die Kanzerogenität besitzt. Eine langsame Acetylierung ist vor allem dann ein Risiko, wenn zusätzlich eine exogene Belastung durch berufliche Schadstoffe oder Tabakrauch besteht. Brockmüller et al. fanden 1996 heraus, dass bei beruflicher Exposition eine verminderte Acetylierungsgeschwindigkeit

und damit ein erhöhtes Karzinomrisiko bereits bei mässigen Rauchern zu finden ist.

Vor allem in der Leber werden die aromatischen Amine zu Orthoaminophenolen metabolisiert und anschliessend nach Konjugation mit Sulfat oder Glucuronsäure über die Niere ausgeschieden. Die im Urin durch Hydrolyse freigesetzten Orthophenole wirken durch eine DNS-Veränderung kanzerogen (Ganten et al., 1998; Jocham, 2007).

Neben dem Rauchen und der beruflichen Belastung durch Giftstoffe sind auch ausgewählte Medikamente sowie chronisch entzündliche Harnwegserkrankungen ursächlich für die Entstehung eines Harnblasenkarzinoms. Auch die Schistosomiasis, eine vor allem in Tropen und Subtropen auftretende chronische Infektionskrankheit, die durch Trematoden (Saugwürmer) verursacht wird, wurde als Ätiologiefaktor dieses Karzinoms benannt. Hierbei ist das seltenere Plattenepithelkarzinom der Harnblase als Komplikation möglich. Einige Monate nach Infektion äußert sich die Erkrankung am Urogenitaltrakt mit Zystitis, Hämaturie, Fibrose und Kalzifikation der Blasenwand bis hin zur Entstehung eines Karzinoms – selbst im Kindesalter (Pschyrembel, 2002).

Weiterhin sind in der Literatur vor allem 3 Medikamente genannt, die die Entstehung eines Urothelkarzinoms begünstigen: Chlornaphazin, Phenacetin und Cyclophosphamid. Diese wurden vor allem bis 1963 zur Therapie der Polyzythämia vera verwendet. Auch heute sind nach länger dauernder Cyclophosphamid-Therapie regelmäßige urinzytologische Tests empfohlen (Zaak et al., 2003).

Es ist anzunehmen, daß zum Entstehen eines Harnblasenkarzinoms nicht eine einzige Noxe, sondern ein multifaktorielles Geschehen - eine Plurikarzinogenese - „...durch Zusammenwirken kompletter bzw. inkompletter initiierender und promovierender Karzinogene...“ ursächlich ist (Jocham, 2007).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass vor allem exogene und damit möglich zu vermeidende Einflüsse für die Entstehung des Harnblasenkarzinoms verantwortlich sind. Die Prävention besteht demnach vor allem in der

Expositionsvermeidung und in der Früherkennung insbesondere bei Hochrisikokollektiven.

2.2.3 Pathogenese

Da das Erscheinungsbild des Harnblasenkarzinoms stark variiert, bedarf es einer differenzierten Diagnostik, einer stadienadaptierten Therapie und einer dem individuellen Geschehen angepassten Verlaufskontrolle. Über die Prognose der Erkrankung bestimmen Histologie, Malignitätsgrad und Wachstumsverhalten (oberflächlich/infiltrierend, unifokal/multifokal) des Tumors (Jocham, 2007).

Überwiegende Lokalisation der meist papillär-zottig-strukturierten Tumoren sind die Blasen hinterwand, die Seitenwände und das Trigonum. Tumoren am Blasendach oder an der Vorderwand sind mit weniger als 9% eher selten (Jocham, 2007). Mindestens die Hälfte aller Harnblasentumoren wachsen multilokulär mit gleichen oder unterschiedlichen Tumorentitäten.

Grundsätzlich zu unterscheiden sind gutartige von malignen Tumoren der Harnblase, wobei die malignen Tumoren epithelialen oder mesenchymalen Ursprungs sein können. Weiterhin lassen sich primär von der Blase ausgehende Tumoren von denen, die die Blase von außen infiltrieren - auch in Form von Metastasen - abgrenzen.

Ursprung nahezu aller maligner Tumoren der Harnblase ist das Urothel. 95% weisen ein papilläres Wachstumsmuster auf. In lediglich 7% finden sich Plattenepithelkarzinome, die auch im Endstadium eines Urothelkarzinoms auftreten können. Adenokarzinome treten nur in ca. 1–2%, bevorzugt am Blasendach, vom Urachus ausgehend, auf. Durch Infiltration (weibliches Genitale, Prostata, Kolon) und Metastasierung (Mamma-, Magen-, Bronchialkarzinom, Melanom) entstehende sekundäre Blasentumoren sind mit < 1% ausgesprochen selten. Mesenchymale Tumoren der Harnblase können sowohl benigner (Fibrom, Myxom, Leiomyom, Hämangiom, Neurofibrom, Neurinom, Phäochromozytom (selten auch maligne)) als auch maligner

Einleitung

(Leiomyosarkom, Fibrosarkom, Rhabdomyosarkom, retikuloendotheliale Tumoren, Karzinosarkome) Natur sein und treten ebenfalls sehr selten auf (Rübben, 2007; Böcker et al., 2004).

Im Übergangsepithel der Blase entstehen die malignen epithelialen Tumoren entweder über einen nicht invasiven papillären Tumor (Papillom, papilläres Karzinom) oder ein flaches Carcinoma in situ. Es folgt die Entdifferenzierung in ein invasives, papilläres Karzinom oder ein invasives, solides Urothelkarzinom. Vorausgehend sind meist Dysplasien (Präkanzerosen). Diese lassen sich in 3 Schweregrade einteilen (leichte, mittelschwere und schwere Dysplasien) die durch Kernatypien und eine gestörte Ausreifung der Urothelzellen imponieren (Böcker et al., 2001).

Als Sonderform der malignen Formationen im Harnblasenepithel wird das Carcinoma in situ beschrieben. Es zählt zu den oberflächlichen Karzinomen, infiltriert die Schleimhaut, nicht allerdings die darunter liegende Basalmembran. Das intraepitheliale Wachstum dieser Dysplasie mit histologisch nachweisbaren schlecht differenzierten Zellen, die große, unregelmäßige Zellkerne, sowie eine gesteigerte Mitose aufweisen, besitzt eine sehr hohe maligne Potenz in Progression und Infiltration (Jocham, 2007).

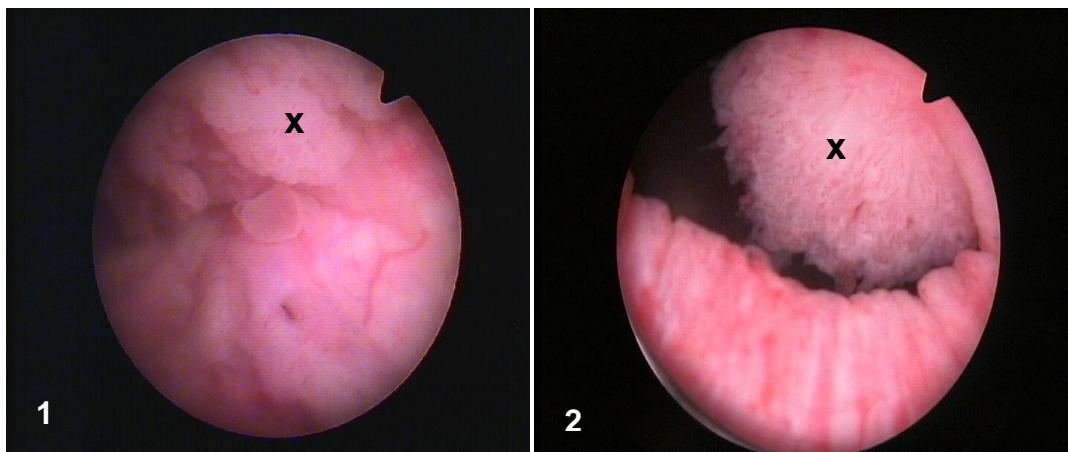


Abb. 1: Zystoskopische Darstellung eines exophytischen Tumors am linken Harnleiterostium (1) und am Blasenausgang (2) (x= Tumor) (aus: Hegele, 2005)

2.2.4 Klassifikation

Die Stadieneinteilung erfolgt nach dem laut der WHO 2016 aktualisierten TNM-System.

T symbolisiert die lokale Ausbreitung des Tumors, N den Lymphknotenbefall und M die Fernmetastasierung.

Die Schichten der Harnblasenwand, die der Tumor infiltrieren kann, sind (von innen nach aussen): Schleimhaut, Lamina propria, Submucosa, Muscularis (innere und äussere Schicht), Adventitia und – bei Männern – Prostata als unmittelbar anliegendes Organ.

Die klinische TNM-Einteilung unterscheidet zum einen nicht muskelinfiltrierende Karzinome (non muscle-invasive bladder carcinoma NMIBC, Ta, Tis, T1) von die Harnblasenwand bis zur Lamina muscularis infiltrierend (T2a, T2b) wachsenden Tumoren. Im Stadium T3 besteht eine perivesikale Tumordinfiltration (mikroskopisch T3a, makroskopisch T3b), im Stadium T4 sind andere Nachbarorgane wie Prostata, Vagina, Uterus oder Becken betroffen.

In der T-Kategorie können folgende Zusatzklassifizierungen ergänzt werden: (m) symbolisiert das Auftreten multipler Läsionen und (is) das Vorhandensein eines assoziierten Carcinoma in situ. Weiterhin kennzeichnet pTNM, dass die Klassifikation aus dem Biopsat durch den Pathologen bestimmt wurde (Sobin et al., 2002).

Einleitung

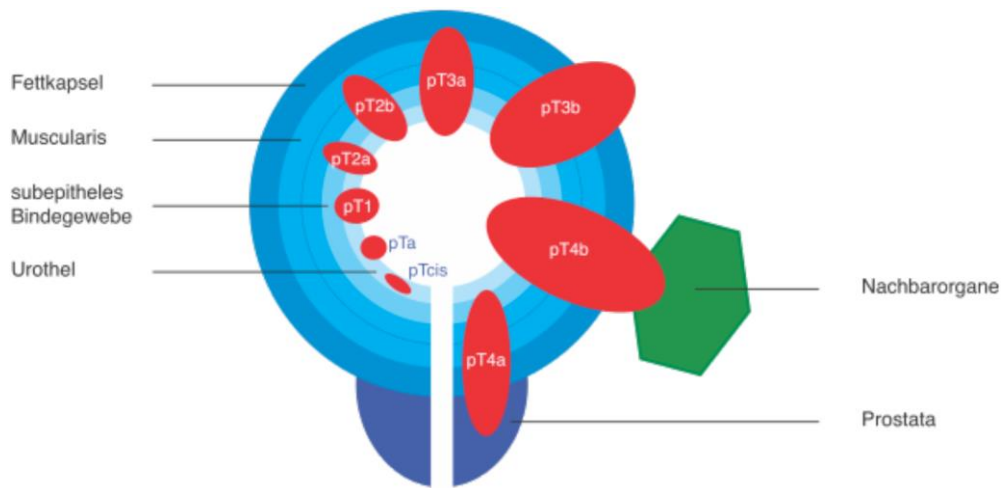


Abb. 2: TNM-Klassifikation, (eigen erstellte Grafik)

Das N-Stadium (N0 – N3) beschreibt ob und welche Lymphknoten vom Tumor befallen sind. Liegt keine Fernmetastasierung vor, wird dies mit M0 angegeben. Liegen dagegen Fernmetastasen vor, wird dies mit M1 angegeben.

Tumorstadien des Harnblasenkarzinoms nach WHO 2016 (Moch et al., 2016)

T Primärtumor

TX	Primärtumor kann nicht bewertet werden
T0	Kein Nachweis von Primärtumor
Ta	Nicht-muskelinvasives papilläres Karzinom
Tis	Carcinoma in situ: „Flache Neoplasie“
T1	Tumor infiltriert subepitheliales Bindegewebe
T2	Infiltration der Muskularis propria
T2a	oberflächliche Infiltration der Lamina muscularis propria (innere Hälfte)
T2b	tiefe Infiltration der Lamina muscularis propria (äußere Hälfte)
T3	Perivesikale Tumorerinfiltration
T3a	mikroskopische perivesikale Infiltration
T3b	makroskopische perivesikale Infiltration (Extravesikale Masse)
T4	Tumorerinfiltration von Nachbarorganen
T4a	Infiltration Prostatastroma, Samenbläschen, Uterus oder Vagina
T4b	Infiltration Becken- oder Bauchwand

N Regionaler Lymphknotenbefall

NX	Regionale Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	keine regionalen Lymphknoten (LK)
N1	Metastase in einem Lymphknoten des wirklichen Beckenbereiches (ein hypogastrischer, obturatorischer oder

Einleitung

	präsakraler Lymphknoten oder ein Lymphknoten aus dem Bereich der A. iliaca externa)
N2	Metastase in mehreren Lymphknoten des wirklichen Beckenbereiches (ein hypogastrischer, obturatorischer oder präsakraler Lymphknoten oder ein Lymphknoten aus dem Bereich der A. iliaca externa)
N3	Metastasen der Lymphknoten an der A. iliaca communis

M Fernmetastasen

M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Daraus ergibt sich folgende Stadieneinteilung:

Stadium	Primärtumor	Lymphknotenbefall	Metastase
0a	Ta	N0	M0
0is	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2a-b	N0	M0
III	T3a-b	N0	M0
	T4a	N0	M0
IV	T4b	N0	M0
	Jedes T	N1-3	M0
	Jedes T	Jedes N	M1

Insbesondere bei invasiven Tumoren soll als weiteres Klassifizierungsmerkmale das histopathologische Grading - gekennzeichnet durch den Grossbuchstaben G, gemäß der WHO-Klassifikation von 1973 angegeben werden (Leitlinienprogramm, 2016).

Im Grading (G) wird der Grad der Zelldifferenzierung, der von nicht bestimmbar über gut differenziert bis hin zu undifferenziert reicht, beschrieben. Hierbei gilt: Je undifferenzierter das Gewebe, umso ungünstiger die Prognose. Untenstehende Tabellen zeigen die ursprüngliche Fassung aus dem Jahr 1973 und folgend das 2010 aktualisierte System der UICC.

G- Grading-System WHO 1973

GX	Differenzierungsgrad nicht bestimmbar
G1	Gut differenziert
G2	Mäßig differenziert
G3	Schlecht differenziert/undifferenziert
G4	Undifferenziert

G- Grading System UICC 2010

Urotheliales Papillom

Papilläre Neoplasie mit niedrig malignem Potential (PUNLMP)

„low grade“ entspricht G1(gut differenziert) und Anteile von G2 (mäßig differenziert)

„high grade“ entspricht G2-G3 (schlecht bis undifferenziert)

Die R-Klassifikation beschreibt das Fehlen oder Vorhandensein und somit die mikro- oder makroskopische Größe eines Residualtumors (RX: Vorhandensein oder Fehlen eines Residualtumors kann nicht beurteilt werden, R0: kein Residualtumor, R1: mikroskopischer, R2: makroskopischer Residualtumor) (Jocham, 2007).

Die Wahrscheinlichkeit der Metastasierung ist Untersuchungen zufolge mit abhängig von der Tiefe der Infiltration: So zeigten sich bei Tumoren, die tiefe Muskelschichten infiltrieren, doppelt so häufig Tumordinvasionen in Blut und Lymphgefäßen wie bei nicht invasiv gewachsenen Tumoren. Ist das perivesikale Fettgewebe befallen, sind in über 60% Fernmetastasen, vor allem in Leber, Lunge und Skelett, zu finden. Die Lymphknoten der Obturatoriusgruppe (75%) sind am häufigsten betroffen, gefolgt von denen der A. iliaca externa (65%) und denen der A. iliaca communis (20%) (Zaak, 2003; Jocham, 2007).

2.2.5 Klinik

Kardinalsymptom und häufiges Erstsymptom des Harnblasenkarzinoms ist die schmerzlose Hämaturie (Makro- oder Mikrohämaturie). 68-97.5% der Patienten mit einem Harnblasenkarzinom weisen eine Makrohämaturie auf (Shephard et al., 2012).

Auch irritative Miktionsbeschwerden, wie therapieresistente Dysurie, Pollakisurie und eine Drangsymptomatik bzw. rezidivierende Infekte sollten an das Vorliegen eines Harnblasenkarzinoms denken lassen. Beim Mann ist eine Zystitis immer suspekt und sollte hinsichtlich der Möglichkeit des Vorliegens eines Harnblasenkarzinoms abgeklärt werden.

In Spätstadien können Harnstauungsniere, suprasymphysäre Schmerzen, Flanken- und Rückenschmerzen, Beinschwellungen durch verminderten Lymphfluss sowie allgemeine Tumorsymptome (Gewichtsverlust und Abgeschlagenheit sowie Anämie) auftreten (Jocham, 2007).

2.2.6 Diagnostik

Die **körperliche Untersuchung** stellt einen wichtigen Aspekt dar, bei der besonderes Augenmerk auf Symptome gelegt wird, die auf ein fortgeschrittenes Stadium hinweisen. Hierzu zählt vor allem beim Mann die digitale rektale Untersuchung der Prostata und der Ampulla recti und bei der Frau die vaginale Untersuchung. Zur genaueren Beurteilung der inneren Organe nutzt man die **Sonographie** mit deren Hilfe eine bestehende Hydronephrose sowie eventuelle Lebermetastasen diagnostiziert werden können (Jocham, 2007).

In der **Urinanalyse** kann die häufig auftretende Hämaturie oder gar maligne Urothelzellen entdeckt werden. Mittels der Urinzytologie und auch speziellen Verfahren, wie der Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung (FISH) oder der Immunzytologie lässt sich ein Verdacht verifizieren (Cha et al., 2012). Spezielle Marker-basierte Urindiagnoseverfahren (beispielhaft seien hier der BTA

(Bladder-Tumor-Antigen)-Test und NMP22 (Nukleäres Matrixprotein 22) zu nennen), haben vor allem aufgrund der falsch-positiven Ergebnisse noch keinen Einzug in die Routinediagnostik gefunden (Hosseini et al., 2012).

Laborchemisch erfolgen eine Laboruntersuchung des Serumkreatinins zur Überprüfung der Nierenfunktion, sowie eine Bestimmung der Gerinnungsparameter für anschließende evtl. notwendige invasive Maßnahmen (Jocham, 2007; Oosterlinck et al., 2007).

Die Blasenspiegelung, **Zystoskopie**, ist die wichtigste Untersuchungsmethode, ermöglicht den Nachweis als auch die Lokalisation des Tumors und stellt den diagnostischen Goldstandard dar. Die Weißlichtendoskopie ergänzend können optimierend tumorspezifische Fluoreszenzmarker (Bsp: Hexaminolevulinate (HAL, HEXVIX®)) eingesetzt werden (Photodynamischen Diagnostik (PDD)). Auf den folgend dargestellten Abbildungen markiert die umschriebene rote Fluoreszenz ein Carcinoma in situ, das in der herkömmlichen Weißlichtendoskopie leicht übersehen werden kann. Die Anwendung von HAL, HEXVIX® zeigte sowohl bei der Detektion als auch bei der therapeutischen Tumorentfernung deutliche Vorteile (Gakis, 2016).

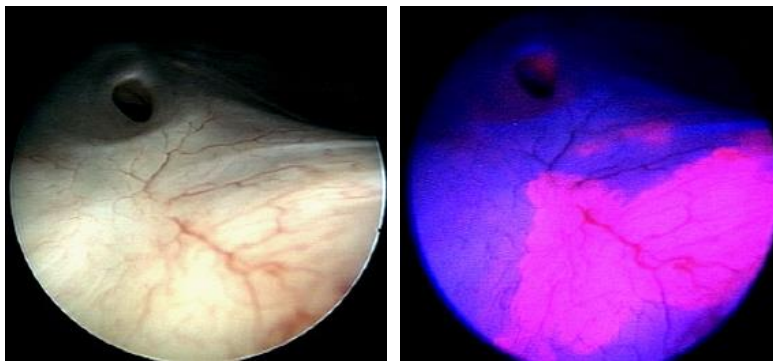


Abb.3: Weißlichtendoskopie (links) versus Fluoreszenzendoskopie (rechts), mit der ein Carcinoma in situ detektiert werden kann (aus www.urologe-neustandt.de)

Differentialdiagnostisch sollten bei der Zystoskopie Koagel, Steine und beim Mann zusätzlich ein Mittellappenadenom der Prostata ausgeschlossen werden. Die hierbei gewonnene Spülflüssigkeit dient dem histologischen Nachweis von

Tumorzellmaterial. Zellen des in der Zytoskopie schlecht zu identifizierenden Carcinoma in situ können so mit einer Sensitivität von >90% nachgewiesen werden. Hochdifferente Tumorzellen können aufgrund der Ähnlichkeit mit dem gesunden Urothel nur in 60% richtig erkannt werden (Jocham, 2007).

Diagnostisch wertvoll sind **bildgebende Verfahren** insbesondere zum Staging: Hier unterscheidet sich die Vorgehensweise entsprechend der vorliegenden Tumorentität (nicht-muskelinvasives versus muskelinvasives Karzinom). Neben der bereits oben erwähnten Sonographie stellen Infusionsurogramm, CT, MRT und die Knochenszintigraphie wichtige diagnostische Parameter dar.

Außer der morphologischen Beurteilung von Nieren, Harnblase und Leber ermöglicht die Sonographie zusätzlich die Suche nach Metastasen im kleinen Becken. Je nach Tumorlokalisierung oder Muskelinfiltration sollte eine Bildgebung des oberen Harntraktes erfolgen, ggf ergänzend eine CT-Urographie, ein MRT oder ein Ausscheidungsurogramm.

Weiterhin dienen die **Computertomographie** (CT) und **Magnetresonanztomographie** (MRT) dem Nachweis ausgedehnter Wandüberschreitungen oder Infiltrationen in Nachbarorgane sowie Metastasen. Pelvine Metastasen sind allerdings erst ab einer Grösse von >2cm sicher nachweisbar. Die **Knochenszintigraphie** wird zum Nachweis knöcherner Metastasen genutzt, eine Bildgebung des Schädels nur bei klinischer Symptomatik (Leitlinienprogramm, 2016; Huland, 2006; Paik et al., 2000).

Die **transurethrale Resektion der Blase** (TUR-B) erfolgt vor allem beim oberflächlichen Harnblasenkarzinom nicht nur als ein Eingriff mit diagnostischer, sondern auch kurativer Zielsetzung. Hierbei wird repräsentatives Gewebe für die pathologisch-histologische Beurteilung gewonnen und eine vollständige Entfernung des Tumorgewebes im Gesunden angestrebt (Jocham, 2007; Leitlinienprogramm, 2016)

Die TUR-B erfolgt stufenweise. Sie erlaubt durch mehrere, festgelegte Resektionsschritte der unterschiedlichen Tumoranteile ein präziseres Grading

und eine Senkung der Tumorpersistenz im kritischen Randbereich (Oosterlinck et al., 2002).

Die Prognose beeinflussende Kriterien wie multifokales Tumorwachstum, eine Tumorgöße über 5 cm oder begleitende Urotheldysplasien und Carcinomata in situ entscheiden über das weitere therapeutische Vorgehen wie beispielsweise der Indikation einer adjuvanten Therapie (Jocham, 2007).

Die Mehrheit der Patienten (ca. 75%) weist bei Erstdiagnose ein nicht-muskelinvasives Karzinom (Ta, Tis, T1) auf. In 20% der Fälle wird ein muskelinvasives Tumorstadium (T2-4) diagnostiziert, während bei 5% der Betroffenen das Karzinom bereits bei Diagnosestellung metastasiert ist.

70% der nicht-muskelinvasiven Tumoren rezidivieren in den ersten zwei Jahren nach erfolgter Behandlung, wovon sich 10-20% zu einem muskelinvasiven Karzinom entwickeln (Heney, 1992; Amling, 2001).

2.2.7 Therapie

Über das therapeutische Vorgehen entscheiden vor allem die im Vorfeld bereits erwähnten diagnostischen Maßnahmen sowie die durch Probengewinnung bei der TUR-B gesicherte Histologie. Ein rein oberflächlicher Tumor (Ta) kann von einem Carcinoma in situ mit intakter Basalmembran (Tis) oder einem infiltrierenden Tumor (T1 oder höher) unterschieden werden, wodurch aufgrund der steigenden Gefahr einer Metastasierung eine deutlich schlechtere Prognose resultiert. Nach eingehender Diagnostik erfolgt die Therapie des Harnblasenkarzinoms stadienorientiert (Lehmann et al., 2005).

Therapie des nicht muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms (NMIBC)

In den Stadien pTa, pTis und pT1 stellt die TUR-B bereits die erste therapeutische Maßnahme dar. Hohe Rezidivraten insbesondere bei Hoch-Risikotumoren und multifokalen Tumoren nach Erstresektion führen in der Literatur zu einer Empfehlung einer Nachresektion im Abstand von 2-6 Wochen (Hartinger, 2013).

Aufgrund der weiterhin beschriebenen Rezidivquote von bis zu 70% in den ersten 2 Jahren wird eine postoperative Blaseninstillationstherapie mit BCG oder Chemotherapeutika (beispielsweise Mitomycin C) empfohlen. Dies sollte insbesondere beim Auftreten eines Carcinoma in situ oder multifokalem Wachstum des Tumors durchgeführt werden. Gemäß Metaanalysen senken beide genannten Medikamente die Progressionsrate der Tumoren, wohingegen die Rezidivrate durch BCG-Installation signifikant besser gesenkt wird (Malmström, 2009).

Der genaue Wirkmechanismus ist ungeklärt. Die Instillationstherapie erübrigt allerdings nicht die postoperativ in Abständen von 12 Wochen durchzuführenden Kontrollzystoskopien.

Häufige Gründe für einen Therapieabbruch sind vor allem nach BCG-Instillationen die Nebenwirkungen wie massive zystistische Beschwerden, Organtuberkulosen von Hoden, Prostata und Nieren sowie Schüttelfrost und Fieber (Böcker et al., 2003; Jocham, 2007; Leitlinienprogramm, 2016).

Misslingt die zuvor beschriebene lokale Tumorkontrolle, ist eine radikale Zystektomie indiziert.

Folgende Tabelle stellt die Empfehlung der Europäischen Gesellschaft für Urologie (EAU) für die Rezidiv- und Prophylaxetherapie, entsprechend dem zugehörigen Risikoprofil, dar.

Einleitung

Risikogruppe		EAU-Empfehlungen
Definition		
Niedrig	Unilokulär, Ta, G1 Tumor < 3 cm	1. primäre komplette TUR-B 2. Frühinstillation eines Chemotherapeutikums
Intermediär	Ta, T1, G1-2 Multilokulär Tumor > 3cm	1. primäre komplette TUR-B 2. Frühinstillation eines Chemotherapeutikums 3. (optional) Re-TUR-B 4. Adjuvante intravesikale Chemo- oder Immuntherapie (BCG)
Hoch	T1 G3, Cis Multilokulär rasches Rezidiv	1. primäre komplette TUR-B 2. Frühinstillation eines Chemotherapeutikums 3. Re-TUR-B 4. Adjuvante intravesikale Immuntherapie mit BCG (Erhaltungsschema) oder radikale Zystektomie bei Versagen der BCG-Therapie

Tab.: Empfehlungen der EAU zur Behandlung des oberflächlichen Blasenkarzinoms (modifiziert nach Oosterlinck et al, 2007; Babjuk et al, 2008)

Therapie des muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms

Ansichts der therapeutischen Überlegenheit gegenüber nicht-invasiven Methoden stellen chirurgische Maßnahmen heutzutage die onkologisch effizienteste Therapie dar.

Bei muskelinfiltrierenden Tumoren ($\geq T2$ -Stadium) ist die **radikale Zystektomie** als operative Therapie Mittel der Wahl (Jocham, 2007; Leitlinienprogramm, 2016).

Bei der radikal chirurgischen Methode werden beim Mann kurativ Harnblase sowie Prostata mit Samenblasen, bei der Frau Harnblase sowie Uterus, Adnexe, Harnröhre mit der vorderen Scheidenwand entnommen und eine entsprechende Harnableitung über ein sogenanntes inkontinentes Stoma (Ileum- oder Kolon-Conduit) oder eine Ersatzblasenkonstruktion aus Dünn- und Dickdarm (Ileum-Neoblase oder katheterisierbarer Pouch mit Nabelstoma) konstruiert. Welches Verfahren der Harnableitung gewählt wird, ist von Tumorstadium, einem

möglichen Befall der prostatistischen Harnröhre und dem Allgemeinzustand als auch dem Wunsch des Patienten nach adäquater Aufklärung abhängig.

Beim Ileum- oder Kolon-Conduit werden die Harnleiter in ein ausgeschaltetes distales Ileum- oder Kolon-Segment implantiert. Das distale Ende wird anschliessend als inkontinentes Stoma in die vordere Bauchwand eingenäht und kann dann mit einem Beutelsystem versorgt werden (Böcker et al., 2001; Leitlinienprogramm, 2016).

Bei der sogenannten kontinenten Harnableitung wird aus Dünndarm bzw. aus Dünn- und Dickdarm eine Ersatzblase konstruiert, in die die Harnleiter münden. Sie gilt als Reservoir und kann bei den verschiedenen Pouch-Formen über den Nabel mittels eines Einmalkatheters oder bei der Ileum-Neoblase, bei der die Ersatzblase mit dem Harnröhrenstumpf verbunden ist, mittels Bauchpresse, entleert werden.

Nach kurativer Operation zeigen sich im Verlauf bei 30-50% der Patienten Metastasen – dies spiegelt die Aggressivität des Tumors wieder. Um diese doch schlechte Prognose zu verbessern ist die perioperative cisplatin-basierte Chemotherapie als Standard anzusehen und in den deutschen S3-Leitlinien verankert. Inwieweit eine neoadjuvante- oder eine adjuvante Therapie Vorteile aufweist ist unklar und aktuell in der Diskussion. Relevante Faktoren zur Therapieentscheidung fehlen bis heute.

Eine Blasenwandteilresektion ist aufgrund der hohen Rezidivgefahr und des meist multifokalen Tumorwachstums nicht sinnvoll. Auch eine Strahlentherapie wird meist nur in Kombination mit einer Chemotherapie angewandt, da sie allein einer operativen Therapie unterlegen ist. Bei fortgeschrittenen Tumorstadien, und somit fehlendem kurativen Ansatz, wird ggf. eine palliative TUR und/oder Zystektomie vorgenommen (Leitlinienprogramm, 2016).

Therapie des metastasierten Harnblasenkarzinoms

Bei metastasierenden Urothelkarzinomen ist die Cisplatin-basierte Polychemotherapie Mittel der ersten Wahl (siehe folgende Tabelle). Hierbei

wurden komplette Remissionen bis zu 50% beschrieben. Aufgrund des günstigeren Toxizitätsprofil kommt in Europa vorwiegend die Gemcitabin/Cisplatin-Kombination bei gleicher Effektivität zum Einsatz.. In den USA findet Docetaxel häufigere Anwendung und seit 2018 werden außerdem die Immuncheckpointinhibitoren Pembrolizumab, Nivoluman und Atezolizumab genutzt (Leitlinienprogramm, 2020).

Die Strahlentherapie kommt zur palliativen Behandlung von Tumorschmerzen oder therapierefraktären Blutungen zum Einsatz.

First-line-Chemotherapie	Cisplatinhaltige Chemotherapie <ul style="list-style-type: none">• Gemcitabin/Cisplatin oder• MVAC (Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin, Cisplatin) oder• Hochdosis-MVAC
---------------------------------	---

Tab.: Modifiziert nach S3-Leitlinie zur Chemotherapie des metastasierten Harnblasenkarzinoms, 2020

Blaseninstillationstherapie

Aufgrund der hohen Rezidivwahrscheinlichkeit des nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms erreichte die bereits in frühen Jahren entwickelte Blaseninstillationstherapie eine zunehmend große Bedeutung.

Chemotherapeutika

Zur zytostatischen Instillationstherapie kommen lokale Chemotherapeutika zum Einsatz, wie z.B. Mitomycin C, Doxorubicin, Epirubicin (Sylvester et al., 2006; Oosterlinck et al., 2007). Bei Karzinomen der Niedrig-Risikogruppe ist eine einmalige Frühinstillation ausreichend, während bei Tumoren mit intermediärem Risiko die Langzeitprophylaxe mit Mitomycin C oder Epirubicin empfohlen wird (Sylvester et al., 2004; Murta-Nascimento et al., 2007).

Bei ca. 50% der Patienten kommt es darunter aufgrund der lokalen Toxizität der eingesetzten Substanzen zu leicht- bis mässiggradigen Nebenwirkungen.

BCG (Bacillus Calmette-Guérin)

Calmette und Guérin entwickelten zu Beginn des 20. Jahrhunderts den Lebendimpfstoff BCG aus *Mycobacterium bovis*, der ab 1921 als Prävention gegen die Tuberkulose eingesetzt wurde (Böhle et al., 1997). 1929 entdeckte Pearl die antitumorale Wirkung der Tuberkulose, als er feststellte, dass Tuberkulosepatienten seltener an Malignomen erkrankten als Nichtinfizierte (Pearl, 1929). 1976 berichtete die Arbeitsgruppe um Morales über die ersten klinischen Erfolge von BCG beim Harnblasenkarzinom im Rahmen von intravesikalen und intrakutanen Therapieversuchen (Morales et al., 1976). Später konnte Ratliff zeigen, dass die immunmodulatorische Wirkung von BCG nur in Zusammenhang mit einem intakten Immunsystem funktioniert (Ratliff et al., 1987).

Bis heute hat sich BCG als erfolgreichste Option der Rezidivprophylaxe beim nicht-muskelinvasiven Blasenkarzinom, insbesondere bei Hochrisikotumoren, behauptet. Der genaue Wirkmechanismus ist jedoch bis dato noch nicht vollständig verstanden (Garcia-Cuesta EM et al., 2015; Jocham, 2007).

Ein Hauptunterscheidungsmerkmal des heute angewendeten BCG-Impfstoffs im Vergleich zum ursprünglichen *Mycobacterium-bovis*-Stamm ist die fehlende Virulenz. Eingesetzt werden vitale, lyophilisierte BCG-Keime in standardisierter Dosierung, die bei intravesikaler Instillation eine lokale Entzündung erzeugen, wodurch ein massiver Einstrom immunkompetenter Zellen wie Granulozyten, Lymphozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen (DC's) ausgelöst wird (Böhle et al., 1990). Diese Zellen sezernieren unter der Stimulation von BCG proinflammatorische Zytokine, vor allem Interleukin-12 (IL-12) und Interferon- α (IFN- α), die als entscheidende Faktoren der BCG-induzierten Zelltoxizität gelten. Neben der Zunahme der Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), sezernieren BCG-aktivierte-Killerzellen (BAK) Perforin, welches schließlich zur Tumorzellyse führt. Im murinen orthotopen Blasenkarzinommodell führt die intravesikale BCG-Therapie zur erhöhten Expression von Interferon, während Interleukin-4 (IL-4) deutlich geringer ausgeschüttet wird. Es resultiert also ein TH-1-gewichtetes Zytokinmilieu (McAveny et al., 1994; De Boer et al., 2003).

In der Literatur ist außerdem beschrieben, dass sich im murinen Modell nach

BCG-Instillation Zytokine der TH-1- und TH-2-gewichteten Immunantwort (Interleukin-5, Interleukin-10) im Urin nachweisen lassen. Das Vorkommen des typischen TH-2-Zytokins Interleukin-4 (IL-4) konnte jedoch nicht belegt werden (McAveny et al., 1994).

Histologisch zeigen sich suburotheliale Granulome, die noch bis zu einem Jahr nach der BCG-Therapie nachweisbar sind und auf eine langfristige Aktivierung des Immunsystems hindeuten (Böhle et al., 1996; Suttman et al., 2006).

In vergleichenden Studien mit Chemotherapeutika bzw. Immunmodulatoren zeigt BCG eine höhere Effektivität mit gleichzeitigem Einfluss auf die Tumorprogression. In der Nachbeobachtungszeit von 2,5 Jahren ist die Progression bei Anwendung von BCG um 4% verringert. Besonders Patienten mit Cis profitieren von dieser Therapie (Lamm et al., 2000; Sylvester et al., 2002). Liegt ein Karzinom mit hohem oder intermediärem Risiko vor, wird die topische Immuntherapie mit BCG empfohlen (Vgl. Tabelle 4) und stellt heute die Standardtherapie des Cis und aller oberflächlichen G3-Tumoren dar (Sylvester et al., 2004).

Nebenwirkungen wie Fieber, Dysurie, Infektionen des Urogenitalsystems, sowie Pneumonie und Hepatitis sind aufgrund der bei lokaler Applikation toxischen Wirkung von BCG beschrieben. Umgangssprachlich als „BCG-itis“ bekannt, kommt es nahezu immer zu einer durch BCG ausgelösten Zystitis, welche ggf. auch eine systemische Symptomatik auslösen kann (s.u.). Je nach Ausprägung kann dies zu mangelnder Patientencompliance bis hin zu Therapieabbrüchen führen.

Vor allem die empfohlenen Erhaltungstherapie von BCG, die mindestens 12, besser 36 Monate erfolgen sollte, weist eine hohe Nebenwirkunsrate auf und verlangt die intensive und individuelle Begleitung des Patienten (Jocham, 2007).

2.2.8 Nachsorge und Prognose

Der Nachsorge kommt aufgrund des hohen Rezidivrisikos (bis zu 70% nach vollständiger, histologisch gesicherter TUR-B) eine große Bedeutung zu (Ganten, 1998; Jocham, 2007; Merkle, 1997).

Nach TUR-B erfolgt dies zum einen durch die zuvor beschriebene Blaseninstillationstherapie. Wichtig sind aber insbesondere auch regelmäßige zystoskopische Verlaufskontrollen gemäß der S3 Leitlinien, welche sich an der Risikogruppe orientieren.

Auch nach erfolgter kurativer Zystektomie werden stadienabhängig im Rahmen der uroonkologischen Kontrollen Blut- sowie sonographische und radiologische Kontrollen empfohlen (Leitlinienprogramm, 2016; Böcker, 2001; Jocham, 2007).

Oberflächliche Harnblasentumoren weisen eine sehr gute Prognose auf, wohingegen die 5-Jahres-Überlebensrate bei fortgeschrittenen Karzinomen noch deutlich geringer einzuschätzen ist. In Zahlen ausgedrückt stehen sich 5-Jahres-Überlebensraten von ca. 50% beim muskelinfiltrierten Karzinom (T2) gegen <10% beim metastasierten Harnblasenkarzinom (Lymphknoten oder Fernmetastasen) gegenüber. Die oberflächlichen Karzinome zeigen bei sorgfältiger Prophylaxe und Nachsorge eine 5-Jahres-Überlebensrate von nahezu 100% (Jocham, 2007).

2.3. Immunologische Grundlagen

2.3.1 Das Immunsystem

Die Immunologie ist die Wissenschaft der biologischen und biochemischen Abwehrmechanismen, die den menschlichen Körper beim Kontakt mit Krankheitserregern und Toxinen schützen. Diese Abwehrmechanismen repräsentieren das Immunsystem, welches unter Umständen lebenslangen Schutz, sog. Immunität, verleihen kann.

Aufgabe des Immunsystems ist es, in den Organismus eingedrungene Krankheitserreger wie Pilze, Bakterien, Protozoen und deren Toxine, sowie virusinfizierte Zellen und auch Tumorzellen zu erkennen und zu inaktivieren bzw. abzutöten. Dabei gelingt es dem Immunsystem, zerstörerische Antworten gegen den eigenen Organismus in den meisten Fällen abzuschalten. Anforderungen an das Immunsystem sind also nicht nur eine effektive Abwehr und Möglichkeiten der Elimination zu besitzen, sondern es muss auch eine sichere Unterscheidung zwischen "selbst" und "fremd", sowie zwischen "gefährlich" und "ungefährlich" treffen (Janeway et al., 2002).

Zu den Akteuren des Immunsystems gehören sowohl - von pluripotenten hämatopoetischen Zellen abstammende - zelluläre wie auch lösliche Komponenten, die bestimmte Kaskaden von Reaktionen auslösen. Grundsätzlich unterscheidet man das unspezifische und das spezifische Immunsystem.

2.3.1.1. Das unspezifische Immunsystem

Zu den Aufgaben des unspezifischen (syn.: angeborenen) Immunsystems zählen Abwehrmechanismen, die unabhängig vom Erreger aktiv werden. Erste Barrieren für Eindringlinge sind der Säuremantel der Haut und die intakte Epidermis. Gelingt das Eindringen, greifen das sogenannte Komplementsystem, antimikrobielle Enzymsysteme und unspezifische Mediatoren wie Interleukine und Interferone ein.

Außerdem befinden sich auf zellulärer Seite Granulozyten, das Monozyten-Makrophagensystem und die natürlichen Killerzellen.

Beispiel einer unspezifischen Antwort ist eine Entzündungsreaktion oder Fieber. Auch das Erkennen von fremden Substanzen zählt in den Aufgabenbereich des unspezifischen Immunsystems. Hierbei bedient es sich der MHC-Komplexe (Haupthistokompatibilitätsantigene), die jede körpereigene Zelle markieren. Nicht identisches Vorkommen oder Fehlen dieses Komplexes kennzeichnet

Eindringlinge und löst Abwehrreaktionen aus (Janeway et al., 2002; Male et al., 2005).

Die zellulären Bestandteile des angeborenen Immunsystems, die **Phagozyten**, zu denen Granulozyten, Monozyten und dendritische Zellen zählen, besitzen die Fähigkeit - dem Organismus fremde - Mikroorganismen oder Flüssigkeiten aufzunehmen („phagein“ (griech.) = „essen“) und sie entsprechenden Zellen zu präsentieren. Das Erkennen erfolgt unter anderem über bestimmte Aminosäure-Sequenzen, die bei körperfremden Eindringlingen hochkonserviert auftreten, im normalen Wirtsgewebe allerdings nicht vorkommen. Sie werden als **PAMPs** (**p**athogen-**a**ssociated **m**olecular **p**atterns) bezeichnet und können von spezifischen Muster-Erkennungsrezeptoren auf den Phagozyten (engl.: **P**attern recognition receptors; **PRR**) erkannt werden. Man unterscheidet 3 Formen der PRR: Sezernierte, Endozytische und Signalübertragende. Diese unterscheiden sich in der Art der Mikroorganismenelimination (Gemsä et al., 1997; Janeway et al., 2002; Male et al., 2005).

Eine bedeutende Rolle im System der angeborenen Immunität spielen die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Sie werden durch bestimmte Interferone oder Zytokine der Makrophagen aktiviert und setzen an der Oberfläche der gebundenen Zielzelle zytotoxische Granula frei, deren enthaltene Effektorproteine die Zellmembran durchdringen können und unmittelbar den programmierten Zelltod auslösen. Das Erkennen von virus- oder anderweitig infizierter Zellen erfolgt über Rezeptoren, die anhand der MHC-Expression zwischen eigen bzw. fremd unterscheiden können. Körpereigene Zellen können sich vor dem Angriff durch sogenannte „killerhemmende Rezeptoren“ (KIRs oder lektinähnliche CD94) schützen. Die Wirkung der NK-Zellen wird durch Kontakt mit IFN- α und - β , TNF- α vor allem aber mit IL-12 potenziert (Janeway et al., 2002; Ljunggren et al., 1990; Moretta et al., 2002). Ihr Wirkspektrum kommt vor allem in der frühen Phase von Infektionen zum Tragen.

Als wichtiges, die beiden Systeme verbindendes Glied, sind die Dendritischen Zellen (DC) zu nennen. Sie exprimieren signalübertragende als auch endozytische PRR und stimulieren die Sekretion von Chemokinen und Zytokinen, deren spezifisches Milieu unter anderem als Startsignal für das spezifische System dient und gelten als die leistungsstärksten Antwortauslöser naiver T-Zellen (Gemsa, 1995; Janeway et al., 2002).

2.3.1.2. Das adaptive Immunsystem

Während die Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems nach wenigen Stunden einer Erregerkonfrontation in Kraft treten, benötigt das adaptive (syn.: spezifische) Immunsystem bei Erstkontakt mit einem Erreger bis zu 2 Wochen, um mittels eigens produzierter Antikörper mit der spezifischen Immunantwort zu reagieren.

Zelluläre Hauptbestandteile des adaptiven Immunsystems sind B- und T-Lymphozyten. Von ihren Differenzierungssorten, dem Knochenmark (B-Lymphozyten) und dem Thymus (T-Lymphozyten) wandern sie zu den peripheren (sekundären) lymphatischen Organen (Milz, Lymphknoten, Mukosa-assoziierte lymphatische Gewebe = MALT), von wo aus sie aktiv werden. Sie können auf ein jeweiliges Antigen, das Ihnen von dendritischen Zellen, Makrophagen und auch B-Zellen selbst präsentiert werden kann, hochspezifisch reagieren und klonal expandieren. So wird eine adäquate und effektive Antwort mit Gedächtnisfunktion möglich. Die Optimierung und Terminierung des Reaktionsablaufes regeln bestimmte Zytokine und auch T-Lymphozyten selbst (Janeway et al., 2008).

Wichtig für die spezifische immunologische Antwort ist die Differenzierung der T-Lymphozyten (T-Helfer-0-Zellen = TH-0) in TH-1- und TH-2-Zellen. Das beim ersten Erregerkontakt durch das unspezifische System induzierte Zytokinmilieu (IL-12, IFN- γ , IL-4) sowie der Kontakt mit Antigenpräsentierenden Dendritischen Zellen (APC) über spezifische Rezeptoren (MHC-II mit TCR; CD-80 mit CD-28) bilden Ausgangspotential und bedingen die Differenzierung in TH-1- oder TH-2-

Einleitung

Zelle. Hierbei ist bereits die Konzentration der entsprechenden Zytokine entscheidend: Herrscht eine hohe Konzentration des Zytokins IL-12 vor, so entwickeln sich die Zellen zur TH-1-Linie. Es kommt zu einer inflammatorischen T-Zellantwort, die die Entstehung der TH-2-Zelllinie hemmt. Im Gegensatz dazu steht die Entwicklung zu TH-2-Zellen und damit einer B-Zelldifferenzierung bei einer geringen Konzentration von IL-12, die wiederum als Gegenspieler der TH-1-Zelllinie imponiert (Muraille et al., 1998).

Folgende Tabelle zeigt die Unterschiede der Zelllinien TH-1 und TH-2 in Zytokinexpression, der jeweiligen Zellaktivierung und dem daraus folgenden Wirkungsmechanismus.

	TH-1-Zellen	TH-2-Zellen
Sekretion von	IL-2 IFN- γ TNF- β GM-CSF	IL-4 IL-5 (IL-3,-6,-7,-8,-9,-10,-14)
Aktivieren	Makrophagen	B-Zellen
Wirkung	Entzündungsvorgänge, Abtöten intrazellulärer Erreger	Produktion von Antikörpern

Zu den Effektorzellen gehören außer den TH-1- und TH-2-Zellen ebenso die zytotoxischen T-Zellen. Sie unterscheiden sich voneinander in der Art der Fremdartigenpräsentation. Die zytotoxischen T-Zellen bilden das Pendant der Natürlichen Killer-Zellen im angeborenen Immunsystem. Durch den identischen Wirkmechanismus rufen sie nach Aktivierung durch die kostimulative Wirkung der dendritischen Zellen den programmierten Zelltod hervor (Siegal et al., 1999; Biron et al., 1998).

2.3.1.3. Die Bedeutung der Zytokine

Als wichtige lösliche Mediatoren bei immunologischen Reaktionen besitzen die unterschiedlichen Zytokine eine Vielzahl von Aufgaben (= Pleiotropie). Man unterscheidet Interferone, Interleukine, Koloniestimulierende Faktoren (colony stimulating factors = CSF), Chemokine und Tumornekrosefaktoren.

Von diversen Zellen sezerniert, bilden sie wichtige Funktionen sowohl in der Verbindung des angeborenen und des adaptiven Systems als auch in der Übermittlung der T-Zell-Wirkung (Janeway et al., 2008).

In der nachfolgenden Tabelle sollen wichtige Zytokine mit Ihren Hauptfunktionen vorgestellt werden.

Bezeichnung	Familie	Produzierende Zellen	Wirkungen	Effekt des Zytokin-Rezeptor Knock outs (soweit bekannt)
IL-4	Hämatopoetine	T-Zellen, Mastzellen	B-Zellaktivierung, IgE-Wechsel, hemmt TH-1-Zellen	Verringerte IgE-Synthese
IL-6	Hämatopoetine	T-Zellen Makrophagen, Endothelzellen	Wachstum und Differenzierung von B- und T-Zellen, Produktion von Akute-Phase-Proteinen, Fieber	Verminderte Immunantwort der akuten Phase, erniedrigte IgA-Produktion
IL-10	nicht zugeordnet	T-Zellen, Makrophagen, EBV-transform. B-Zellen	Wirksamer Inhibitor von Makrophagenfunktion	Vermindertes Wachstum, Anämie, chronische Enterocolitis
IL-12	nicht zugeordnet	B-Zellen, Makrophagen	Aktiviert NK-Zellen, induziert die Differenzierung von CD-4-T-Zellen zu TH-1-ähnlichen Zellen	Gestörte IFN- γ -Produktion und Th-Reaktion
TGF-β	nicht zugeordnet	Chondrozyten, Monozyten, T-Zellen	hemmt Zellwachstum, entzündungshemmend, induziert IgA-Freisetzung	Tödliche Entzündung

Einleitung

TNF-α	TNF-Familie	Makrophagen, NK-zellen, T-Zellen	Lokale Entzündung, Endothelaktivierung	Resistenz gegen septischen Schock, Anfälligkeit für Listeria
IFN-γ	Interferone	T-Zellen, NK-Zellen	Makrophagenaktivierung, erhöhte MHC-Molekül Antigenprozessierungskomponenten-expression, IG-Klassenwechsel, hemmt TH-2-Zellen	Verringerte Resistenz gegen bakt. Infektionen (Mykobakterien) und bestimmte Viren

Das Zusammenspiel der beiden Arme des Immunsystems verbildlicht Abbildung 4.

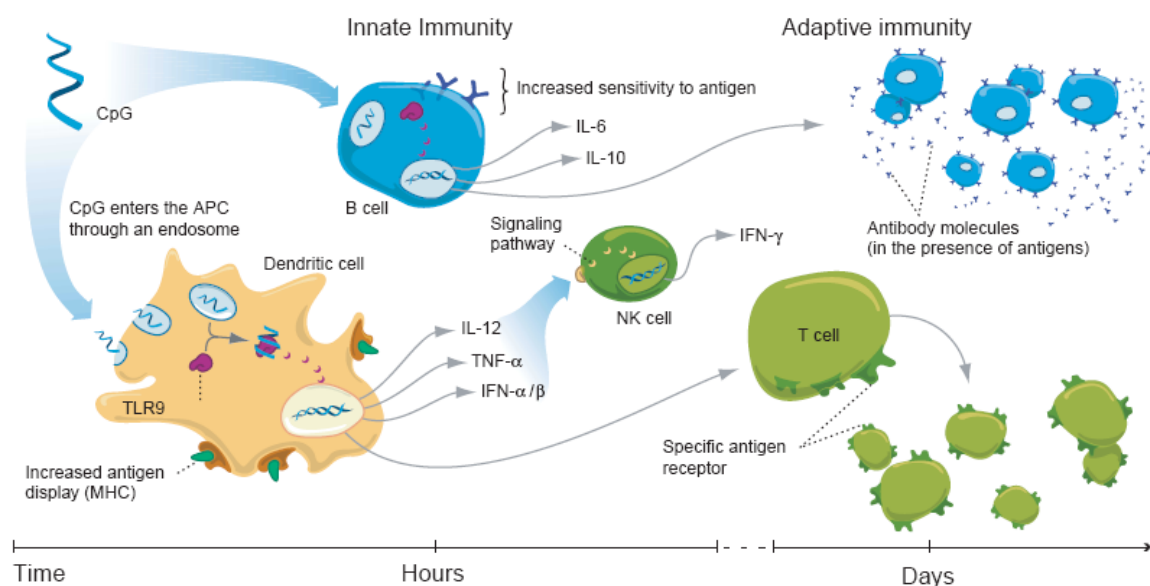


Abb. 4: Interaktion zwischen den beiden Armen des Immunsystems. Über Stimulation (zum Beispiel durch CpG-ODN) erfolgt zunächst die Aktivierung des angeborenen Immunsystems und Bildung eines TH-1-spezifischen Zytokin- und Chemokinmilieus. Sekundär aktivierte NK-Zellen gewinnen lytische Aktivität, B-Zellen werden durch Antigenpräsentation stimuliert und exprimieren kostimulatorische Moleküle, was wiederum zu einer T-Zell Aktivierung führt (modifiziert nach Krieg, 2003).

2.3.1.4. Tumorspezifischer Wirkmechanismus des Immunsystems

Die Tatsache, dass das körpereigene Immunsystem Tumorzellen erkennen und schließlich bekämpfen kann ist derzeitige Interesse vieler Forschungen.

So ist es dem Organismus möglich, Tumorzellen über die von ihnen sezernierten Tumorantigene zu erkennen und daraufhin eine spezifische Antwort zu initiieren (Graziano DF, 2005). Ausserdem gelingt es ihm, eben diese Zellen als „gefährlich“ zu klassifizieren und sie effizient zu „beobachten“ (Rock KL, 2005). Es konnte gezeigt werden, dass passive und geringfügig auch aktive Immuntherapie bei Krebserkrankungen effektiv ist und daher die Kombination aus Immuntherapie mit Standardtherapieverfahren sinnvoll sein kann (June CH et al., 2007).

Ebengenannte Thesen sind durch Folgendes in Realität erschwert:

Im Gegensatz zu Bakterien und Toxinen weisen Tumorzellen lediglich minimale Veränderungen gegenüber Normalzellen auf. Die Antigene, die sie als fremd und schädlich entlarven können, liegen meist nur in Form weniger Peptide vor.

Mittels „escape“-Mechanismen entziehen sich die Tumorzellen der Immunüberwachung:

Das Fehlen von Antigenen, reduziertes Auftreten von Antigen-präsentierenden MHC-Molekülen oder eine fehlerhafte Antigenprozessierung vor Präsentation bilden die Hauptmechanismen des „Versteckspiels“.

Um die Immunantwort auf bekannte Tumorzellen zu lenken begann bereits Ende des letzten Jahrhunderts der amerikanische Chirurg William Coley autologe Tumorzell-Lysate zu injizieren (Coley, 1991). Er hoffte damit eine antitumorale Immunantwort hervorzurufen. Modifiziert wurde die Methode später durch die Gabe von Adjuvantien. Hierzu verwendete man vor allem bakterielle Antigenmischungen - in erster Linie des Mykobakterienstammes **Bacillus Calmette-Guérin** (BCG) (Janeway et al., 2008).

2.3.2. Immunstimulative Tumorthherapie

2.3.2.1. BCG – Entwicklung und Wirkmechanismus

Anfang des 20. Jahrhunderts entwickelten die Franzosen Albert Calmette (1863–1933) und Camille Guérin (1872–1961) aus Rindertuberkelbazillen den Lebendimpfstoff gegen Tuberkulose. Durch das Verwenden unterschiedlicher Nährmedien gelang es ihnen einen avirulenten Stamm zu züchten, der 1921 zum ersten Mal am Menschen angewandt wurde. Er erwies sich als der sicherste und weitgenutzte Impfstoff und wurde nach seinen Forschern benannt: Bacillus-Calmette-Guérin (Böhle A et al., 2006).

Der genomische Vergleich des *Mycobacterium bovis*-Urstamms und dem heute verwendeten BCG zeigte einen signifikanten Unterschied (Behr MA et al., 1999). Dieser ist vor allem auf den bei der Attenuierung gelungenen Verlust der Virulenzgene zurückzuführen, der ihn heute als einen effizienten Immunmodulator auszeichnet.

Wie 1987 Ratliff et al. zeigten, ist der Wirkmechanismus grundsätzlich abhängig vom zellulären Immunsystem, da im Tierversuch mit athymogenen Nacktmäusen die Wirkung des BCG ausblieb (Ratliff et al., 1987). Nach der Instillation kommt es zunächst zum Einstrom von Granulozyten, denen Lymphozyten und Makrophagen folgen (de Boer EC, 1992). Akzessorische Monozyten, bzw. Dendritische Zellen, sezernieren nach Aufnahme der Mykobakterien die Schlüsselzytokine IL-12 (und in geringerem Ausmass IFN- α). Es folgt eine vor allem TH-1-gewichtete Immunantwort, die zur Produktion weiterer wichtiger Zytokine führt: IL-2 und IFN- γ . Diese beiden gelten als Hauptverantwortliche in der Entstehung BCG-induzierter Zytotoxizität. Man beobachtete, dass die Aktivität der NK-Zellen über die Effektivität der BCG-Therapie entscheiden (Ratliff TL et al., 1987; Brandau S et al., 2007). Vor allem Monozyten und CD-4⁺-Zellen, die zu den BAK (BCG-aktivierte-Killerzellen) zählen, töten durch das von ihnen sezernierte, porenbildende Perforin die Tumorzellen (Brandau S et al., 2007). Insgesamt können im Urin der Patienten nach BCG-Instillation eine Reihe unterschiedlicher Zytokine, die sowohl für eine TH-1- als auch TH-2-T-Zellantwort sprechen, nachgewiesen werden (Böhle A, 2006; de Boer EC, 1997).

Lage beschrieb das histologische Vorhandensein von Riesenzellen und epitheloidzelligen Granulomen, die von dichten Arealen von Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten gesäumt seien (Lage JM, 1986).

Vor allem suburotheliale Granulome, die sich bis zu einem Jahr nach BCG-Therapie nachweisen lassen, sind Anhaltspunkte für die Vermutung einer langanhaltenden lokalen Immunreaktion.

Immunhistologisch ist selbst nach einem Zeitraum von über 6 Monaten in der Blasenwand - als Zeichen der lokalen immunologischen Reaktion – eine erhöhte Expression von Aktivierungsmarkern (HLA-DR und ICAM-1) sowie MHC-II-Moleküle zu finden (Morales, 1976).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass durch die Instillation von BCG eine lokale Entzündungsreaktion hervorgerufen wird, die durch das Aktivieren des zellulären und humoralen Immunsystems zum Abtöten der Tumorzellen durch NK-Zellen führt. Die häufig auftretenden Nebenwirkungen der BCG-Instillation limitieren diese erfolversprechende Therapie. Gerade deshalb wird es relevant, neue Therapieansätze zu erarbeiten, die ähnlich effiziente aber besser verträgliche Wege der Tumorbekämpfung ermöglichen.

2.3.2.2. CpG-ODN

Entwicklung

Die Entdeckung, dass bakterielle DNA immunstimulative Wirkungen hat, geht bis ins 19. Jahrhundert zurück. 1893 berichtete der New Yorker Chirurg William Coley, dass sich die Tumoren von Sarkom-Patienten nach intratumoral injizierten, bakteriellen Lysaten (Streptokokken, später: „Coley’s toxine“) zurückbildeten. Erst 100 Jahre später erkannte man, dass durch die Imitation einer bakteriellen Infektion eine spezifische antitumorale Immunantwort verstärkt wird (Coley, 1991).

1984 wiesen Tokunaga et al. nach, dass bakterielle DNA innerhalb bakterieller Lysate die höchste antitumorale Aktivität aufweist (Tokunaga et al., 1984). Im

Gegensatz dazu besitzt die DNA von Wirbeltieren diese Fähigkeit nicht (Yamaoto et al., 1992).

Wenig später konnte ebendiese Arbeitsgruppe um Yamamoto die immunstimulatorische Wirkung bakterieller DNA auf Palindrome oder spiegelsymmetrische Nukleotidsequenzen mit einem zentral stehenden Cytosin-Guanosin (CG)-Dinukleotid zurückführen. Es gelang ihnen, diese mittels synthetischer Einzelstrang-Oligonukleotide (ODN) zu imitieren (Yamamoto et al., 1994).

Erst Arthur Krieg gelang es letztendlich die genauen strukturellen Voraussetzungen für ein optimal immunstimulatives ODN zu formulieren (Krieg AM et al., 1995): Immunstimulativ wirksame ODN besitzen ein, in bestimmten Basenkontext (sog.: „CpG-Motiv“) eingebettetes, zentrales unmethyliertes Cytosin-Guanosin (CG)-Dinukleotid. Allein eine Inversion der Basen innerhalb dieses Motivs zu GC, eine Methylierung des Cytosins oder Veränderung der das CpG-Motiv flankierenden Basen heben den stimulativen Effekt auf (Krieg AM, 2002). So fand man heraus, dass die optimale Basenabfolge GACGTT zur Immunstimulation in der Maus, beim Menschen allerdings die Sequenz CTCGTT benötigt wird, um eine ausgeprägte Stimulation von Immunzellen zu erreichen (Rankin R et al., 2001; Verthelyi D et al., 2001).

In bakterieller DNA treten diese CpG-Motive in einer Häufigkeit von 1:16 (1 von 16 Dinukleotiden) auf, in der DNA von Wirbeltieren liegen sie allerdings nur unterrepräsentiert (1:60) und zusätzlich methyliert, daher unwirksam, vor. So liegt die Vermutung nahe, dass das Erkennen von CpG-Motiven ein wichtiger Abwehrmechanismus des Vertebraten-Immunsystems vor eindringenden mikrobiellen Keimen ist.

Immunstimulativer Wirkungsmechanismus von CpG-ODN:

Das angeborene Immunsystem klassifiziert CpG-haltige DNA als „fremd“ und reagiert mit einer Immunreaktion, um das als „fremd“ erkannte zu bekämpfen. Synthetisch hergestellte Dinukleotide imitieren bakterielle DNA und verstärken so die hervorgerufene Immunreaktion (sowohl *in vivo* als auch *in vitro*).

CpG-Motive zählen zu den PAMPs und werden spezifisch von PRRs – in diesem Fall dem TLR-9 (Toll-like-Rezeptor-9) gebunden (Hemmi H et al., 2000).

Diese Rezeptoren, von denen insgesamt 11 erforscht sind, dienen vor allem der Erkennung bakterieller DNA (Zhang D et al., 2004). Sie gehören zu den signalgebenden pattern recognition Rezeptoren, denen man eine besondere Bedeutung zuschreibt, da sie durch die Aktivierung verschiedener Enzyme die Transkription von Genen regulieren, die eine Entzündungs- oder Immunantwort induzieren und somit die Keimabtötung ermöglichen. Der erste TLR beim Säugetier wurde erst im Jahr 1997 gefunden (Medzhitov R et al., 1997).

Die Entdeckung des TLR-9-Rezeptors, der für das Erkennen des CpG-Motivs ursächlich ist, gelang im Jahre 2000 (Krug A et al., 2001).

Die Rezeptoren setzen sich aus 2 Teilen zusammen: einer extrazellulären und einer transmembranösen (sog. TIR-, Toll-Interleukin-1 Rezeptor) Domäne. TLR-9 wird im Gegensatz zu anderen TLR-Rezeptoren im Endosom der Zelle exprimiert, weshalb eine intrazelluläre Aufnahme der stimulierenden Substanzen erfolgen muss (Patni S et al., 2007; Klinman DM, 2004; Ulevitch RJ, 2004).

Nach Bindung des Rezeptors kommt es zu einer Signalkaskade, die in folgender Abbildung näher erläutert werden soll:

Einleitung

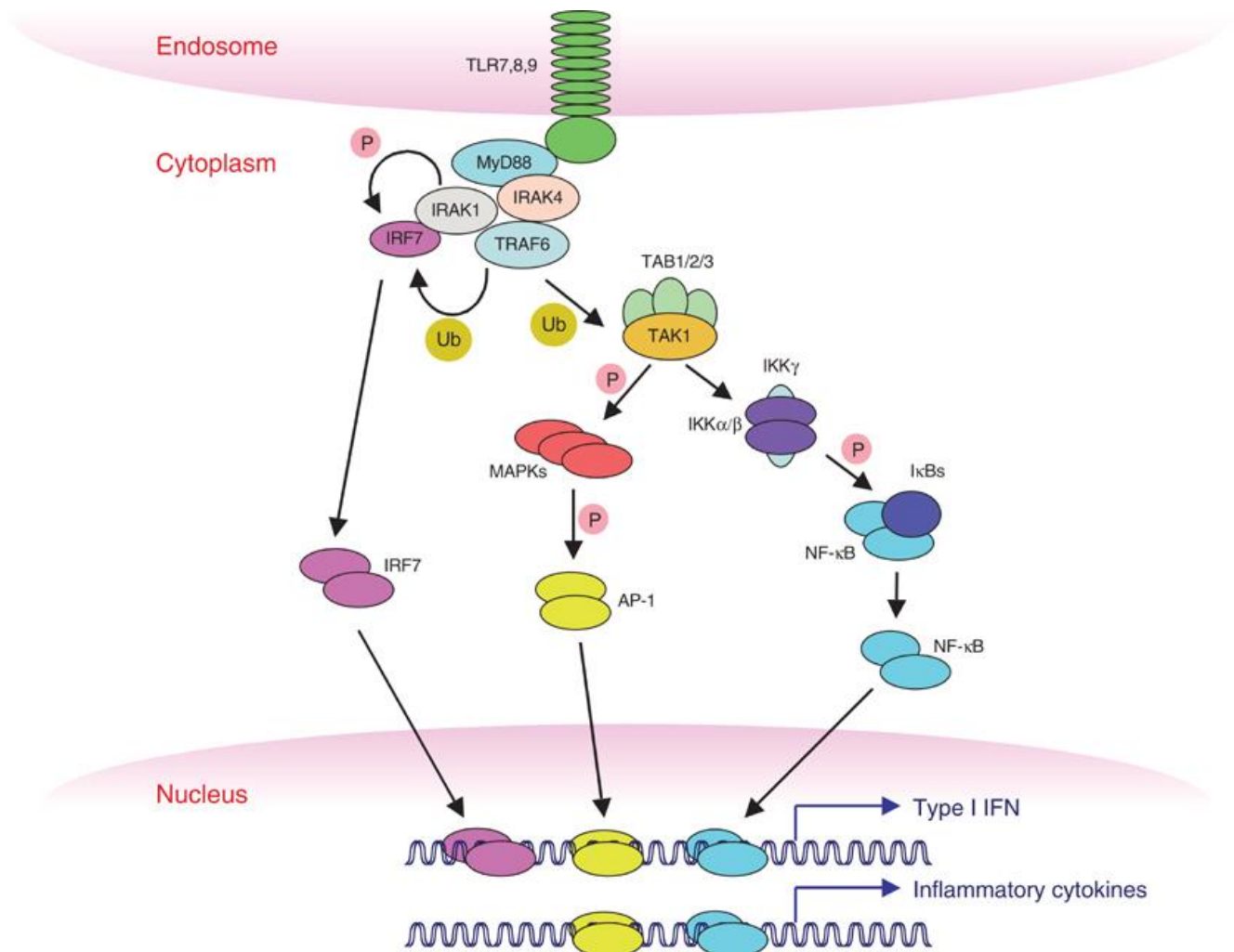


Abb. 5: Kawai T, Akira S: TLR signalling. *Cell Death and Differentiation* (2006) **13**, 816–825.
doi:10.1038/sj.cdd.4401850; published online 20 January 2006

Die im Endosom lokalisierten TLR-Rezeptoren lösen nach Bindung des Liganden einen vom Adaptorprotein MyD88 abhängigen Weg aus: Eine der IRAK-Familie (Interleukin-1 receptor activated kinase) zugehörige Serin–Kinase (IRAK 1, -4) bindet am Rezeptorkomplex und wird mittels Autophosphorylierung aktiviert. Daraufhin folgt die Aktivierung von TRAF6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 6) (blauer und gelber Weg), der die TAP3-Kinase TAK1 stimuliert. Die Aktivierung dieses Komplexes führt über MAPKs zu weiteren Phosphorylierungen und dem Endprodukt AP-1 (gelber Weg). Auf der anderen Seite (blauer Weg) stimuliert TAK1 den inhibitorischen κB-Kinasekomplex (IKK),

aus dem NF κ B entsteht. Die 3. Stimulation (roter Weg) erfolgt über das in PDCs exprimierte IRF-7, das durch IRAK1 phosphoryliert wird.

Die drei Endprodukte IRF-7, AP-1 und NF κ B translozieren in den Nucleus und bewirken hier eine Gentranskription. Gemeinsam regulieren sie die Expression der Zytokine I-IFN und damit auch IFN- α und - β (Kawai T, 2006).

Der TLR-9 wird im humanen Immunsystem nur von B-Zellen und plasmazytoiden dendritischen Zellen (PDC) exprimiert (Hornung V et al., 2002). Die folgende Stimulation lässt sich in 2 Phasen aufteilen: In der ersten, frühen Phase erfolgt die Aktivierung eben genannter Zellen über den Rezeptor selbst. Es erfolgt in eben diesen Zellen eine erhöhte Apoptoseresistenz, Expression kostimulatorischer Moleküle (CD-80, CD-86, CD-40) und des Chemokinrezeptors CCR7, der die Wanderung in die Lymphknoten induziert. Weiterhin kommt es zur Sekretion von TH-1-spezifischen Zyto- und Chemokinen (Krieg AM, 2002). PDCs produzieren reichlich Typ-I-Interferon und differenzieren zu potenten Antigenpräsentierenden Zellen heran (Krug A, 2001). Als sekundäre Effekte treten jetzt getriggert von Zytokinen und Chemokinen unter anderem die Aktivierung myeloider dendritischer Zellen, Monozyten und NK-Zellen sowie eine erhöhte Antikörper-abhängige Zytotoxizität (antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC), durch erhöhte Expression der Fc-Rezeptoren auf Effektorzellen, auf (Krieg AM, 2002).

In der zweiten Phase kommt es durch die bereits in Phase 1 abgelaufenen Reaktionen des angeborenen Immunsystems zu einer Verstärkung der adaptiven Immunität. Den T-Zellen werden vermehrt Antigene in einem TH-1-Zytokinmilieu präsentiert, so dass die Zelldifferenzierung in Richtung TH-1 gefördert wird und vermehrt zytotoxische CD-8⁺-T-Zellen geprimt werden. Zusätzlich kommt es durch den CpG-Kontakt bei zeitgleichem Antigenkontakt zu einer vermehrten antigenspezifischen Antikörperproduktion der B-Zellen (Krieg AM et al., 1995; Sparwasser T et al., 2000).

Tumorspezifische Wirkung des CpG

Wie bereits beschrieben kommt es durch CpG-ODN zur Aktivierung von sowohl unspezifischer und spezifischer zellulärer und humoraler Immunität und daraus resultierend zu einer verstärkten Aktivierung unspezifischer Effektorzellen (NK-Zellen, Makrophagen), die ihrerseits die Antikörper-abhängige Zytotoxizität (ADCC) steigern. Weiterhin erfolgt über die durch CpG stimulierte Differenzierung und Reifung dendritischer Zellen die Ausschüttung verschiedener Zyto- und Chemokine, die eine TH-1-gerichtete Immunantwort hervorrufen (Akira S et al., 2004; Klinman, 2004).

Mehrere Studien zeigten, dass eine alleinige peritumorale Gabe von CpG effiziente antitumorale Immunantworten erzielt und somit zur Regression solider Tumoren führen kann. Selbst eine Bildung von CTL und die Entwicklung einer spezifischen Memory T-Zellantwort konnte in tierexperimentellen Versuchen beobachtet werden (Heckelsmiller K et al., 2002).

Ausgehend von diesen Daten erhofft man sich therapeutische Fortschritte mit CpG-DNA in der Immuntherapie von Tumoren.

Am Beispiel des Harnblasenkarzinoms zeigte sich die intravesikale Immuntherapie mit BCG vor allem bei Hochrisikotumoren effektiver als die Chemotherapie, bei allerdings ausgeprägterem Nebenwirkungs- und Toxizitätsprofil (Böhle et al., 2003).

Bei der Untersuchung des BCGs am Transitionellzellkarzinom zeigte sich, dass durch die Applikation von CpG-ODN im murinen subkutanen Blasenkarzinommodell systemische und lokale Effekte auftreten, welche sich durch verminderte Tumorgröße und dem histologischen Nachweis inflammatorischer Reaktionen darstellen (Hegele et al., 2004).

Ebenso ergaben Untersuchungen am murinen, orthotopen Harnblasenkarzinommodell, dass die singuläre topische Applikation von CpG-ODN antineoplastische Wirkung zeigt. Auch hier war zum einen die Tumorgöße signifikant verringert sowie zum anderen histologisch eine ausgeprägte Entzündungsreaktion nachweisbar (Hegele et al., 2005).

Molekularbiologische Untersuchungen zeigten, dass durch Instillation der immunstimulativen DNA eine Mehrexpression von TH-1- und TH-2-Zytokinen nachweisbar ist. Weiterhin zeigte sich, dass die systemische Gabe von CpG-ODN bei wiederholten subkutanen MB-49 (eine syngene, murine Transitionalkarzinomzelllinie) Applikationen eine protektive und spezifische MB49-Immunität bewirkt (Loskog et al., 2005).

Nach Böhle ist die Blase „...als separates Kompartiment, in dem hohe lokale Konzentrationen von immuntherapeutischen Substanzen und eine effektive Rekrutierung immunkompetenter Zellen möglich sind, ein ideales Zielorgan für diese Art von immuntherapeutischem Ansatz.“ (Böhle A et al., 2006).

2.4. Fragestellung

Die Arbeit unserer Forschungsgruppe befasst sich mit der therapeutischen Wirkung immunstimulativer DNA am Beispiel des Transitionalzellkarzinoms.

Im Vorfeld durchgeführte Versuchsreihen wiesen die bereits beschriebene Wirkung des CpGs im Rahmen einer TH-1-gewichteten Antwort des Immunsystems nach. Grundlage dieser Dissertation ist der Vergleich der CpG-Wirkung beim subkutan induzierten Harnblasenkarzinom von C57BL/6-Mäusen und TLR-9(-/-)Knock-out-C57BL/6-Mäusen.

In den Versuchstierreihen der C57BL/6- und TLR-9(-/-)Knock-out-C57BL/6-Mäusen wurden jeweils Kontroll- und Behandlungsgruppen definiert. Die subkutan induzierten Tumoren wurden nach einem festgelegten Beobachtungszeitraum entnommen und weitergehend auf die Expression folgender Zytokine untersucht: IL-12, IFN- γ und TNF- α als Zeichen der TH-1-gewichteten, sowie IL-4, IL-10 und TGF- β als Hinweis auf eine TH-2-gewichtete Immunantwort.

Ziel ist es, einen Vergleich der beiden Gruppen untereinander, allerdings auch innerhalb einer Versuchstierreihe, zu stellen.

Dazu stellen sich folgende Fragen:

Einleitung

- Wie in Studien beschrieben, bewirkt die Behandlung mit immunstimulativer DNA eine Reduktion der Tumorlast.
 - Gibt es im Vergleich Behandlungsgruppe vs. Kontrollgruppe in beiden Versuchsreihen Unterschiede im Outcome bezüglich Gewicht, Tumorgroße und Allgemeinzustand?
- Findet sich bei den nicht im Zielorgan, sondern subkutan induzierten Harnblasentumoren, nach Behandlung mit CpG eine immunstimulative Wirkung?
 - Präsentiert sich die Wirkung in Form von Zytokinen?
 - Ist es möglich, eine TH-1-gewichtete Immunantwort nachzuweisen?
 - Wie verhalten sich die Zytokine einer TH-2-Immunantwort?
- Der Wirkmechanismus des CpGs wurde in vielen Forschungsreihen über die Signalkaskade des TLR-9-Rezeptors erläutert. Therapiert man Mäuse mit immunstimulativer DNA, denen das Gen zur Expression dieses Rezeptors fehlt, stellen sich folgende Fragen:
 - Findet sich trotz nicht existenten TLR-9-Rezeptors eine immunstimulative Wirkung?
 - Welcher Immunantwort wäre diese zuzuordnen? TH-1- vs. TH-2-Antwort.
- Angenommen, es findet sich in beiden Tierversuchsreihen eine immunstimulative Wirkung nach CpG-Therapie.
 - Inwieweit unterscheiden sich die beiden Gruppen in Bezug auf die Zytokinexpression?

3 Material und Methoden

Die Wirkung immunstimulativer DNA (CpG-ODN) auf die Zytokinexpression am Beispiel des Harnblasenkarzinoms wurde am murinen Modell, ähnlich der von Böhle et al. publizierten Form, untersucht.

Zu Beginn diente die Zellkultur dem Gewinn von Harnblasenkarzinomzellen, die nach ausreichender Züchtung den Versuchstieren appliziert wurden, um ein Karzinom zu erzeugen.

An 2 verschiedenen Mausspezies (weibl. C57BL/6 Mäuse (20-30g, Harlan, Borchon, D.) und weibl. C57BL/6 Mäuse TLR-9-Knock-out (20-30g, Heidelberg)) induzierten wir durch subkutane Injektion ein Karzinom. In der Behandlungsgruppe wurden den Tieren zeitgleich mit der Tumorzellinstillation CpG-Oligonukleotide injiziert. Während eines Beobachtungszeitraums von 13 Tagen wurden die Mäuse klinisch beurteilt, gewogen und schließlich getötet und das gewonnene Tumormaterial (insgesamt 57 Tumoren) molekularbiologisch untersucht.

3.1 Zelllinie

Wir verwendeten die syngene, murine Transitionalkarzinomzelllinie MB49. Bereits in den 70er Jahren wurde dieses Modell von Summerhayes und Franks (Summerhayes und Franks, 1979) etabliert.

3.2 Zellkultur

Chemikalien

- *D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)*, D-MEM+Glutamax, Gibco, BRL Life Technology Inc (Eggenheim, D)
- *Fetales Kälberserum*, FCS 10% - Foetal Bovine Serum Gold, PAA - The Cell Culture Company (Cölbe, D)

Material und Methoden

- *PBS*, Phosphate buffered Saline, PAA - The Cell Culture Company (Cölbe, D)
- *Penicillin-/Streptomycin-Lösung (100x)*, PAA - The Cell Culture Company (Cölbe, D)
- *DMSO*, DMSO-Dimethyl-Sulphoxide, Sigma-Aldrich-Chemie (München, D)
- *Trypanblau*, Trypan blue, ICN Biomedical Inc. (Aurora, USA)

Geräte

- *Hera safe*, Arbeitsbank, Bench, Heraeus (Hanau, D)
- *Nikon Eclipse TE 200*, Phasenkontrastmikroskop, Nikon (Düsseldorf, D)
- *C-5B Julabo*, Wasserbad, Julabo Laboratories GmbH (Seelbach, D)
- *Hera cell*, Wärmeschrank, Heraeus (Hanau, D)
- *Zählkammer 0,0025mm² Neubauer*, Carl Roth GmbH+Co.KG (Karlsruhe, D)
- *Biofuge Stratos*, Zentrifuge, Heraeus (Hanau, D)

3.2.1 Medium- und Zellaufbereitung

Die für das Medium benötigten Substanzen wurden im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

Hierzu gehörten: 500 ml DMEM

5,62 ml Penicillin-/Streptomycin-Lösung

56,2 ml FCS 10%

Im Kühlschrank bei ca 4°C aufbewahrt wurde das Medium nicht länger als 2 Wochen verwendet.

Das Auftauen der Zellen erfolgte nach folgendem Protokoll:

Unter fließendem Wasser wurden die Zellen im Kryotube schnellstmöglich (<1 Minute) aufgetaut, um rasch mit 10 ml eines erstellten Auftaumediums (10% FCS, PBS) 8 Minuten bei 800 Upm zentrifugiert zu werden. Nach Verwerfen des

Überstandes wurde das Zellpellett mit 20 ml Medium aufgefüllt und bei gleichen Bedingungen zentrifugiert.

Nach Resuspendierens des Pellets mit 1 ml Medium wurden 500 µl in eine 50 ml Kulturflasche (Cellstar, Greiner-bio-one) gegeben, die zuvor mit 20 ml Medium befüllt wurde. Mit 1½ Drehungen Deckelöffnung wurde die Kulturflasche im Brutschrank bei 37°C gelagert.

3.2.2. Mediumwechsel und Zellpassage

Die Begutachtung der Zellmorphologie und der Wachstumsbeschaffenheit unter dem Phasenkontrastmikroskop sowie der Mediumwechsel erfolgte in einem 3-Tages-Rhythmus. Einmal pro Woche konnten die Zellen aufgrund der hohen Konfluenz gesplittet werden.

Die hierzu benötigten Substanzen (Medium und PBS) wurden im 37°C Wasserbad erwärmt.

Zunächst wurde überschüssiges Medium aus der Kulturflasche mit einer Saugpipette entnommen. Mit 10 ml PBS erfolgte anschliessend die Spülung, um folgend nach Zugabe von 20 ml Medium mit einem Scraper die am Boden haftenden Zellen vorsichtig zu lösen. Das Zellsuspendat wurde anschliessend mehrfach durch die Saugpipette aufgenommen, um entstandene Zellhaufen voneinander zu lösen. In einem Greinerröhrchen wurde die Zelllösung wie oben erwähnt zentrifugiert und nach Resuspendierung in vorbereitete Kulturflaschen gegeben.

Beim Mediumwechsel wurde lediglich das alte Medium (20 ml) aus den Kulturflaschen gegen neues ersetzt.

3.2.3. Zellzählung

Nach dem Vorbereiten der Zählkammer (Reinigung mit 70% Ethanol, Auflegen des Deckglases, so dass Newtonsche Ringe sichtbar sind) wurde das nach der Zentrifugation gewonnene Zellpellett mit 1 ml Medium resuspendiert. 10 µl dieser

Lösung wurden nun mit 90 µl Trupanblau zusammengegeben und in den oberen und unteren Abschnitt der Zählkammer pipettiert.

Unter dem Phasenkontrastmikroskop zählten wir die äußersten 4 Quadranten der 9 Grossquadrate und bildeten daraus den Mittelwert.

Die Zellzahl pro ml Zellsuspension ergibt sich aus der Multiplikation des errechneten Mittelwertes mit dem Faktor 10.000.

Ziel für die Tierversuche war eine Zellkonzentration von 20 Mio/ml.

3.2.4. Zellaufbewahrung

Um Zellen für einen späteren Verwendungszeitraum nicht unnötig lang zu passagieren wurden einige Zellreihen nach folgendem Protokoll zur Lagerung auf -80°C vorbereitet:

Hierzu bedurfte es eines Einfriermediums, welches sich aus 20% DMSO und RPMI zusammensetzt.

Bestehende Platten wurden wie gewohnt abzentrifugiert und das Zellpellett in vorbereiteten Kryos mit 900 µl RPMI resuspendiert. Auf Eis mussten die Zellen nun mindestens eine halbe Stunde im Kühlschrank verbleiben, bis 900µl des Einfriermediums zu den Kryos zugegeben, sie in Alufolie eingewickelt und 24 Stunden bei -20°C verwahrt wurden. Erst nach diesem Zeitraum konnten die Zellen auf -80°C gelagert werden. Alternativ wurde eine Einfrierkammer verwendet, die durch eine Füllung mit Propanpol das Herabkühlen der Zellen um 1°C stündlich ermöglicht. So konnten die Zellen direkt bei -80°C aufbewahrt werden.

3.3 Tiermodell

3.3.1. Tiere

Wir arbeiteten mit 2 verschiedenen Mausspezies. Zum einen C57BL/6-Mäuse (20-30g, Harlan, Borchon) sowie in Heidelberg gezüchtete TLR-9-Knock-out-

C57BL/6-Mäuse, die im Tierstall des BMFZ (Biomedizinisches Forschungszentrum) der Philipps-Universität Marburg artgerecht in IVC-Käfigen (individually ventilated cages) mit einem Hell-/Dunkelrhythmus von 12/12 Stunden gehalten wurden.

Die Tiere waren mit dem SPF (spezifisch pathogen frei) - Status ausgezeichnet. Um ausreichend Futter- und Trinkwasserbereitstellung, sowie das Säubern der Käfige kümmerte sich das Tierpflegepersonal. Während der Versuchsreihe hielten wir zur besseren Unterscheidung der einzelnen Versuchsobjekte die Tiere in Einzelkäfigen.

Die Mäuse erhielten keinerlei antibiotische Behandlung.

Für die Durchführung der Tierversuche lag die entsprechende Genehmigung des Regierungspräsidiums Gießen vor (Geschäftszeichen: U63-19C20-15(1)MR20/20/#28/2003).

3.3.2. Anästhesie

Alle von uns durchgeführten Versuche wurden unter Vollnarkose der Mäuse verrichtet.

Als Betäubungsmittel verwendeten wir eine Lösung aus Ketaminhydrochlorid (Ketamin 100mg, CuraMED, Karlsruhe, D), Xylazinhydrochlorid (Rompun® 2%, Bayer, Leverkusen, D) und steriler Kochsalzlösung (0,9%, Braun, Melsungen, D). Die Applikation erfolgte intraperitoneal mittels Tuberkulinspritzen (Omnifix®-F, Firma Braun, Melsungen, D) (Abbildung 6).

Die Zusammensetzung von 0,1 mg Ketamin und 0,01 mg Xylazin pro g KG erbrachte eine ausreichende Narkosedauer von ca 1½-2 Stunden.

Zur Applikation des Betäubungsmittels wurde die Maus zwischen Daumen und Mittelfinger im Genick aufgenommen und der Schwanz mit dem kleinen Finger derselben Hand fixiert. Durch Kopftiefhaltung konnte so bei der intraperitonealen Gabe der Anästhetika das Risiko einer möglichen Verletzung von Darmschlingen minimiert werden.

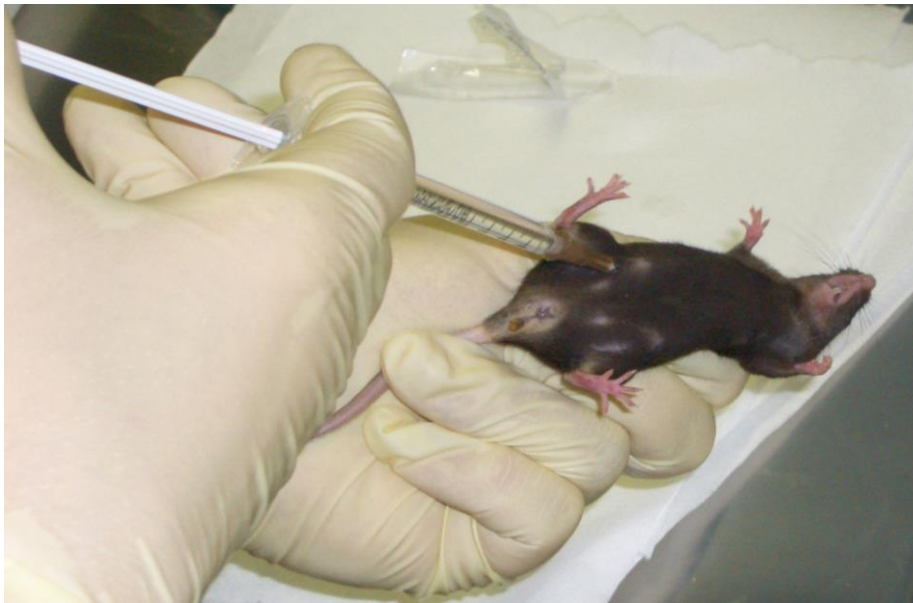


Abb. 6: Anästhesie über intraperitoneale Injektion des Ketamin-Xylazin-Gemisches (eigenes Bildmaterial)

3.3.3. Tumorzellinstillation

Die Instillation der Tumorzellen in die Flanke erfolgte ebenfalls mit einer Tuberkulinspritze. Die auf Eis aufbewahrte Zellsuspension (20 Mio. Zellen/ml) wurde kurz vor Verwendung gevortext.

Mit der linken Hand wurde an der Flanke eine Hautfalte gebildet, in die 0,05 ml (entspricht 1 Mio. Zellen) der Zellsuspension als Depot gegeben wurde. In der Behandlungsgruppe diente die Nadel, die in der Hautfalte verblieb, auch zur Instillation der zuvor aliquotierten CpG-Oligonukleotide (nur rechte Flanke).

Vorsichtig musste beim Herausziehen der Nadel darauf geachtet werden, dass keine Flüssigkeit die Einstichstelle verließ.

3.3.4. Versuchsaufbau

Die Versuchsreihe setzt sich aus 4 verschiedenen Gruppen zusammen, die jeweils 9-10 Tiere beinhaltete.

Pro Mausspezies gab es je eine Kontroll- und eine Behandlungsgruppe, denen durch das Instillieren von 1 Mio. Tumorzellen (MB 49) in die Flanken ein subkutanes Harnblasenkarzinom induziert wurde.

Den Tieren der Kontrollgruppe wurde subkutan im Bereich der rechten Flanke Tumorzellmaterial (1Mio. MB49-Zellen) injiziert, die Tiere der Behandlungsgruppe erhielten im Bereich beider Flanken Tumorzellinjektionen, wobei nach Injektion rechtsseitig, die Nadel in der Einstichposition belassen und über dieselbige 50 µl der CpG 1668-Lösung (entspricht einer Konzentration von 10 nmol) vorbereitete Oligonukleotide gespritzt wurden. Dabei handelte es sich um PTO-modifizierte Oligonukleotide (TIB-MolBiol, Berlin, D).

Die verwendete immunstimulatorische Sequenz der CpG-ODN lautet:

5'- TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT-3' (CpG 1668)

Alle Tiere wurden täglich auf Vitalität untersucht; in einem 3-Tages-Abstand wurde das Gewicht und auch palpatorisch die Instillationsstelle auf Tumorwachstum oder eventuell entstandene Wunden oder Nekrosen hin überprüft.

Gruppe	Tier-Nummer	Tumor rechts	Tumor links
Kontrollgruppe C57BL/6	1-10	10	
Behandlungsgruppe C57BL/6	11-20	10	10
Kontrollgruppe C57BL/6 TLR-9 K.o.	36-44	9	
Behandlungsgruppe C57BL/6 TLR-9 K.o.	45-53	9	9
Summe		38	19
Summe der Tumoren gesamt		57	

3.3.5. Sektion

Nach 13 Tagen Versuchsdurchführung wurden die Tiere in Narkose nach erneutem Wiegen und palpatorischer Untersuchung des Tumors durch zervikale Dislokation getötet.

Es erfolgte die sofortige Entnahme des Tumors (siehe Abbildung 7)



Abb. 7: Tumorentnahme (eigenes Bildmaterial)

und der Milz. Die Sektion begann mit einem Schnitt von der Symphyse bis zum Sternum, woraufhin das Peritoneum dargestellt und eröffnet werden konnte.

Die so gut darstellbaren Tumoren wurden entnommen, deren Größe vermessen, und nach Teilen des Materials zeitnah in Kryotubes (Nunc Cryo Tube™ Vials, Nunc, Wiesbaden, D) gegeben. Die Hälfte des Materials wurde in einen mit Trizol befülltes Tube gegeben, die andere Hälfte wurde direkt in vorbereitetem flüssigen Stickstoff und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C verwahrt.

3.3.6. Probenaufbewahrung

Die Zeit zwischen der Entnahme des Tumormaterials und der Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff dauerte nicht länger als 2 Minuten. Bis zur Weiterverarbeitung des Materials wurden die Proben bei -80°C gelagert.

3.4 Experimentelle Methodik und Durchführung

Aus dem gewonnenen Tumorgewebe galt es zunächst die RNA zu extrahieren, um sie folgend in c-DNA umzuschreiben. Überprüft wurde das Material mittels der qualitativen PCR über das im Labor verwendete Housekeeping-Gen GAPDH. Die Darstellung erfolgte durch Gelelektrophorese.

Es folgte die Etablierung der Real-Time-PCR (RT-PCR), die Aussage über die unterschiedliche Zytokinexpression des Tumormaterials erlaubt.

3.4.1. RNA-Extraktion

Aus dem Tumorgewebe der Mäuse wurde die für die weiteren Untersuchungen benötigte RNA nach einem Protokoll der Invitrogen Laboratories (Karlsruhe, D) gewonnen.

Durch wiederholtes Auswaschen mit Trizol® gelang die Auftrennung des Gewebes, aus dem wir die extrahierte RNA entnahmen und weiterverarbeiteten. Die Reinheit und Konzentration der RNA wurde im Anschluss UV-photometrisch (260/280nm) gemessen.

Chemikalien

- Chloroform: Trichlormethan/Chloroform $\geq 99\%$, CHCl₃, Karl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, D)
- Ethanol absolut, Riedel-de Haën (Seelze, D)
- Isopropanol (2-Propanol), Riedel-de Haën (Seelze, D)
- Nuclease-freies Wasser: nuclease-free water, Promega (Mannheim, D)
- RNase Inhibitor: RNasin® RNase Inhibitor, 10000 U, 40U/ μ , Promega (Mannheim, D)
- TE-Puffer (1:10): aus 10 mM TRIS (0,6055 g), Riedel-de Haën (Seelze, D)
1 mM EDTA (0,186 g), Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, D)
mit Aqua dest. auf 500 ml aufgefüllt
- Trizol: Trizol® Reagent, Invitrogen (Karlsruhe, D)

Geräte

- Homogenisator: Ultra-Turrax T8, IKA-Werke GMBH & CO KG (Staufen, D)

- Kanülen: BD Microlances™-3, Becton Dickinson SA (Heidelberg, D)
- Tuberkulin-Spritzen, BD Plastipak™-1 ml, Becton Dickinson SA (Heidelberg, D)
- UV-Photometer: Gene-Ray UV-Photometer, Biometra® (Göttingen, D)
- UV-Photometer-Küvetten: Präzisionsküvetten aus Quarzglas Suprasil®, Hellma® (Mülheim, D)
- Zentrifuge: Biofuge fresco, Heraeus (Hanau, D)

Durchführung

Nach Auftauen der Proben auf Eis und Hinzugabe von 1ml Trizol wurden sie mit Hilfe des Homogenisators zerkleinert. Die so gewonnene Trizol-Gewebe-Suspension wurde nun 3-5 mal durch eine Tuberkulinspritze mit Kanüle aufgenommen und ins Gefäß zurück gegeben, um die vorhandene genomische DNA zu zerstören. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden zu jeder Probe 0,5 ml Chloroform hinzugegeben, die Lösung 15 Sekunden kräftig geschüttelt und wiederum 5-10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgt eine Zentrifugation bei 12000 Upm und 4°C für 15 Minuten lang, nach der eine Phasenauftrennung in drei Schichten entstand:

- | | |
|---------------------------|---------------------------|
| 1. Obere, klare Phase: | Gelöste Total-RNA |
| 2. Mittlere, weiße Phase: | Protein |
| 3. Untere, rote Phase: | Trizol-Chloroform-Gemisch |

Die oberste Schicht wurde nun in ein neues Eppendorfgefäß (1,5 ml, Eppendorf AG, Hamburg, D) überführt und nach der Zugabe von 0,5 ml Chloroform 2 Minuten kräftig geschüttelt. Es erfolgt abermals eine Zentrifugation von 15 Minuten bei 12000 Upm und 4°C. Nun entstanden 2 voneinander getrennte Phasen. Oben die für die weiteren Schritte wichtige RNA und in der unteren Phase das Chloroform. Nach pipettieren der RNA in ein neues Eppendorfgefäß wurden nochmals 0,5 ml Chloroform zugegeben und wie oben beschrieben zentrifugiert.

Nach Überführung der RNA in ein neues Eppendorfröhrchen folgte nun die Zugabe von 0,5 ml Isopropanol (2-Propanol) zur RNA-Ausfällung.

Bei Raumtemperatur wurde dieses Gemisch für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 12000 Upm und 4°C für 30 Minuten zentrifugiert. Die gewonnene RNA präsentierte sich nun als weißes Pellet am Boden, der Überstand wurde verworfen. Vorsichtig wurde nun entlang des Eppendorfröhrchenrandes 0,5 ml 70% Ethanol (7 ml Ethanol absolut + 3 ml Nuclease-freies Wasser) eingeträufelt und dieses Gemisch für 3 Minuten bei 7500 Upm und 4°C zentrifugiert. Der Rest des Ethanols verdunstete im mit Papier abgedeckten Eppendorfgefäß unter dem Abzug (ca. 30 Minuten). Auf das trockene Pellett wurden nun 50 µl TE-Puffer (1:10) und 0,5 µl RNase Inhibitor (20 U) hinzugegeben. Durch Pipettieren wurde das Pellett aufgelöst und bei -20°C gelagert.

Am folgenden Tag konnte die RNA mittels des Photometers gemessen werden. Hierzu wird eine 1:35-Verdünnung angefertigt (2 µl RNA + 68 µl nuclease-free water). Die RNA wurde langsam im Kühlschrank aufgetaut und kurz zentrifugiert, anschließend wurden in vorbereitete Eppendorfgefäße 2 µl der RNA pipettiert und mit 68 µl nucleasefreiem Wasser gevortext. Während der photometrischen Messung, die bei 260 und 280 nm vollzogen wurde, erfolgte die Aufbewahrung der RNA im Kühlschrank.

3.4.2 Reverse Transkriptions - Polymerase Kettenreaktion (RT- PCR)

Um die für unsere Versuche relevanten RNA-Abschnitte zu untersuchen, mussten diese vervielfältigt werden. Hierzu verwendeten wir das Prinzip der qualitativen PCR (polymerase chain reaction), die es ermöglicht, in vitro beliebige DNA-Sequenzen zu amplifizieren.

Das dafür notwendige Enzym ist die Taq-Polymerase. Als Matritze benötigt sie einen komplementären Strang der zuvor extrahierten RNA (mit Ersatz der RNA-typischen Base Uracil in die in der DNA verwendete Base Tyrosin) – die cDNA (complementary DNA).

Das Umschreiben der RNA in cDNA erfolgt mit einem kommerziell erhältlichen Kit (Omniscript® Reverse Transcription) der Firma Qiagen (Hilden, D) und dem empfohlenen Protokoll des Herstellers.

Chemikalien

- Aqua bidest
- Omniscript® Reverse Transcription (Qiagen, Hilden, D) enthält:
 - 10x Buffer RT
 - dNTP Mix 5mM
 - RNase free water
 - Omniscript Reverse Transcriptase (4U/20µl)
 - Oligo-dT Primer (10µM)
 - RNasin plus/RNase Inhibitor (40U/µl)

Geräte

- Cyclor I: DNA Engine (Gradient Cyclor), PTC-200, Peltier-Thermal Cyclor, (MJ Research Inc., San Francisco, USA)
- Cyclor II: PTC 100, Programmable Thermal Controller, Peltier-Effect Cycling, (MJ Research Inc. San Francisco, USA)
- Vortexer: Lab-Dancer; IKA-Werke GMBH & CO KG (Staufen, D)
- Zentrifuge: Biofuge fresco, Heraeus, (Hanau, D)

Durchführung

Zum Umschreiben der RNA auf cDNA musste eine Zielkonzentration der RNA von 1 µg/µl erstellt werden, die sich nach dem photometrisch ermittelten Gehalt durch Zugabe von nukleasefreiem Wasser errechnen ließ.

Ein aus einem von Qiagen handelsüblichen Kit erstellter MIX (Omniscript®-Mastermix) wurde nun in festgelegter Zusammensetzung vorbereitet:

Es erfolgte die Zentrifugation und das Vortexen aller Substanzen vor dem Pipettieren:

Material und Methoden

- 1 × Mastermix (Omniscript®): 2 µl 10 × BufferRT
- 2 µl dNTP Mix (5mM)
- 2 µl Oligo-dT Primer
- 1 µl RNAsin plus/RNase Inhibitor (40U/µl)
- 1 µl Omniscript Reverse Transcriptase (4U/20µl)

Das Zielvolumen von 20 µl wurde wie folgt pipettiert:

8 µl Mastermix Omniscript® Reverse Transcription (Quiagen, Hilden)

+ x µl RNA

+ y µl nuclease-free water

In vorbereitete Eppendorfgefäße wurden nun errechnete Mengen pipettiert, 10x mit der Pipette gemischt und anschliessend 60 Minuten bei 37°C inkubiert.

3.4.2 Qualitative PCR

Mit dem durch das Umschreiben gewonnenen cDNA folgte nun die qualitative PCR, die es ermöglicht, eine Mehrzahl an DNA-Kopien zu gewinnen.

Um die Reaktion starten zu können, sind 2 Primer (Oligonukleotide; 5' und 3'), 4 Desoxynucleosidtriphosphate (dATP, dTTP, dGTP und dCTP) und eine hitzebeständige DNA-Polymerase nötig.

Jeder Zyklus der PCR durchläuft folgende drei Schritte:

Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation.

Durch Erhitzen der DNA erfolgte ein Durchbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen, die den Doppelstrang stabilisieren. Im nächsten Schritt, dem Primer-annealing, wurde die Temperatur auf 2-3°C unter der Schmelztemperatur der Primer gesenkt, um ein bestmögliches Anlagern der Primer zu gewährleisten (zwischen 50 und 65°C). Schließlich folgte die Phase der Elongation, in der die DNA-Polymerase fehlende Stränge mit freien Nukleotiden auffüllt (beginnend am 3'-Ende des angelagerten Primers). Die hierfür benötigte Temperatur war sowohl von der verwendeten DNA-Polymerase als auch der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes abhängig (meist zwischen 68 und 72°C).

Durch Wiederholung dieser 3 Reaktionsschritte entstand eine nahezu exponentielle Amplifikation des DNA Fragmentes, das sogenannte Amplifikations-Produkt. Die Reaktion wurde limitiert durch den dNTP-, Oligonukleotid- und Taq-Polymerase-Verbrauch. Nach Ablauf mehrerer Zyklen stieg die Anzahl der vervielfachten Sequenz exponentiell. Wir programmierten das Durchlaufen von 35 Zyklen, weswegen man 2^{35} Kopien erhielt (Qiagen, 2004).

Chemikalien

- PAN-System®, Qualitative PCR-Kit (Qiagen, Hilden, D) enthält:

Aqua bidest.

dNTP Mix 5mM

MgCl₂ (Magnesium-Chlorid) 50 mM

PCR Buffer 10x (+15mM MgCl₂)

Taq-Polymerase 5U/μl

Primer A/B, MWG Biotech AG, (Ebersberg, D.):

5'/3' HR GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase);

5' TCA TCA GCA ATG CCT CCT GC- 3';

5' GCT CAG GGA TGA CCT TGC C- 3';

Geräte

- Cyclor: DNA Engine (Gradient Cycler), PTC-200, Peltier-Thermal Cycler (MJ Research Inc., San Francisco, USA)

- Cyclor: PTC 100, Programmable Thermal Controller, Peltier-Effect Cycling (MJ Research Inc. San Francisco, USA)

- Vortexer: Lab-Dancer, IKA-Werke GMBH & CO KG (Staufen, D)

- Zentrifuge: Biofuge fresco, Heraeus (Hanau, D)

Durchführung

Für jede Probe vorbereitete Cups (PCR Softstrips, 0,2ml; Biozym) wurden zuerst mit 2 µl cDNA, die auf Eis gelagert wurden, befüllt und anschließend mit erstelltem MIX auf die Zielgröße von 50 µl aufgefüllt (pro Cup 48 µl MIX).

Die Zusammenstellung des PAN-Supermixes erfolgte nach Zentrifugation und Vortexen aller benötigten Substanzen aus:

Supermix der PCR für 1x (PAN-System):

- 5 µl 10x PCR-Buffer
- 1 µl dNTP Mix
- 1 µl 5' HR GAPDH
- 1 µl 3' HR GAPDH
- 2 µl MgCl₂
- 48 µl Aqua bidest
- 0,25 µl Taq-Polymerase

Wichtig zu beachten ist, dass die Taq-Polymerase erst kurz vor Verwenden aus dem Kühlschrank genommen werden darf und als letzte zum Mix hinzupipettiert wurde. Als Negativkontrolle diente ein Cup, der nur mit Supermix ohne cDNA vorbereitet wurde.

Die Programmierung des Cyclers erfolgte nach untenstehendem Schema:

- 1 - 4:00 min 94°C
- 2 - 0:45 min 94°C
- 3 - 0:45 min 59°C (AT variabel)
- 4 - 1:30 min 72°C
- 5 - go to line 2 for 28 times
- 6 - 0:45 min 94°C
- 7 - 0:45 min 59°C (AT variabel)
- 8 - 5:00 min 72°C forever 8°

Nach Beenden der PCR wurden die Proben bei -20°C aufbewahrt.

3.4.5 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ermöglichte die Auftrennung von Nukleinsäuresträngen nach ihrer Größe. Sie funktioniert wie ein „Sieb“ für die Amplifikate. Ein elektrisches Feld zieht die negativ geladenen Nukleinsäuremoleküle durch die Matrix, wobei die kleineren DNA-Fragmente sich schneller durch das Gel bewegen können und so eine unterschiedliche Auftrennung der Größe der Fragmente nach möglich ist.

Mittels UV-Licht und der geeigneten Computersoftware können die unterschiedlichen Banden im Gel später dokumentiert und analysiert werden.

Chemikalien

- Agarose: Agarose Electrophoresis Grade; Invitrogen life technologies (Karlsruhe, D)
- Aqua bidest
- DNA-Ladder: 100bp DNA-Ladder (50 lanes), Promega, (Mannheim, D)
- Gel Red™, Biotium, Inc. Hayward (California, USA)
- Loading Dye: Blue/orange 6x Loading Dye, Promega, (Mannheim, D)
- TBE-Puffer (1x TBE-Puffer: 5x TBE-Puffer + Aqua bidest im Verhältnis 4:1):
 - 77,04 g Borsäure, H₃ BO₃ Fisher Scientific GmbH (Schwerte, D)
 - 5,58 g EDTA pH 8 Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, D)
 - 118,65 g TRI-Sodium Citrate-2-hydrate, Riedel-de Haën (Seelze, D)
 - 3 l Aqua bidest

Geräte

- Gelkammer: Owl-Separations Systems, Standard PowerPac B25; Thermo Fisher Scientific (Portsmouth, NH, USA)
- Kamera: G2-digital camera; Canon (Krefeld, D)
- Mikrowelle: Express-Cook&Defrost; Sharp (Hamburg, D)
- UV-Kammer: UVT-20; Herolab GmbH (Wiesloch, D)
- Waage: Type 1475, Sartorius (Göttingen, D)

Durchführung

Zur Herstellung des Gels wurde eine Lösung aus 2 g Agarose und 100 ml gefiltertem 1x TBE-Puffer in der Mikrowelle solange aufgeköcht, bis eine klare Flüssigkeit entstand. Nach 3 Minuten konnte das Gel nun in die bereitgestellte Gelkammer gegeben, 10 µl Gel Red® hinzugefügt und mit einem Kamm - ohne Luftblasen zu erzeugen - verteilt werden.

In der Elektrophoresekammer dient gefilterter TBE-Puffer folgend als Laufpuffer. Zur Vorbereitung der Proben, die während der Gelherstellung langsam auf Eis auftauten, und eines Standards zum Auftragen auf das Gel, wurden Eppendorfgefäße verwendet, die folgendermaßen befüllt wurden:

	Negativ Kontrolle	Standard	Probe
Aqua bidest	-	7 µl	-
DNA-Ladder	-	7 µl	-
Loading Dye	2,3 µl	7 µl	2,3 µl
PCR-Produkt	8 µl	-	8 µl

Das Einbringen der Proben in die Geltaschen erfolgte in der Kammer. Es wurden 4,8 µl der jeweiligen Probe vorsichtig in die Geltaschen eingebracht und bei 96 Volt ca. 90 Minuten in der Kammer belassen.

Die Auswertung wurde mit Hilfe eines digitalen Comuterprogramms (biodoc Analyze) und Adobe Photoshop durchgeführt.

3.4.6 Real-Time-PCR

Auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR erlaubt die Real-Time-PCR durch Fluoreszenzmessungen zusätzlich die Quantifizierung der vervielfältigten Amplifikate während eines Zyklus. Proportional mit der Menge der PCR-Produkte nimmt auch die Fluoreszenz zu, wodurch eine gelelektrophoretische Auftrennung überflüssig ist, da die Daten sofort einsehbar sind.

Fluoreszenzstoffe (in unserem Fall SYBRGreen® der Firma Biorad) binden an die doppelsträngige DNA. Durch diese Bindung steigt die Fluoreszenz dieser Farbstoffe, die blaues Licht ($\lambda = 498 \text{ nm}$) absorbieren und grünes ($\lambda = 522 \text{ nm}$)

emitieren. Die Zunahme der sogenannten Target-DNA korreliert daher mit der Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus.

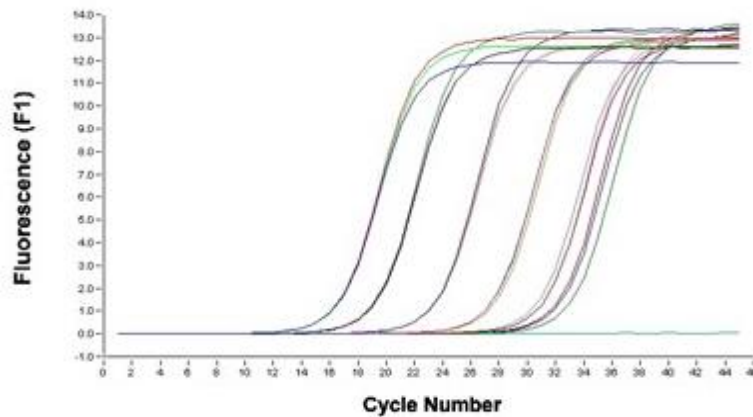


Abb. 8: Originalabbildung des AppliedBiosystems Systems:

Verlauf der Fluoreszenzwerte der quantitativen Real-Time-PCR der seriellen 10-fach Verdünnungsreihe. Die einzelnen Farben entsprechen den von links nach rechts zunehmenden unterschiedlichen Verdünnungsstufen. Während die x-Achse die Anzahl der durchlaufenen PCR Zyklen zeigt, sind auf der y-Achse die Fluoreszenzwerte aufgetragen. Sie erreichen im Bereich der Schwelle (Threshold Cycle) exponentielle Wachstumswerte, was zu einer relativen Stabilität der CT-Werte in diesem Bereich zueinander führt. Anschließend gehen sie in die Plateau-Phase über, in der limitierende Faktoren in der PCR, wie zunehmende Inaktivierung der Taq Polymerase oder der Verbrauch der Primer, zu einem Sistieren einer weiteren Amplifikation führen.

Erst die Schmelzkurvenanalyse ermöglicht durch die Fragmentlängenbestimmung eine Verbesserung der Spezifität, die vorher dank der undifferenzierten Unterscheidung verschiedener PCR-Produkte nicht möglich war. Dies erfolgt durch schrittweises Erhöhen der Temperatur (50-95°C). Jedes Fragment besitzt eine spezifische Schmelztemperatur, bei der sich der Doppelstrang in 2 Einzelstränge teilt. Die Fluoreszenzabnahme wird durch das verlorengegangene SYBR-Green registriert. Unspezifische Primerdimere, die das Ergebnis verfälschen könnten, besitzen eine niedrigere Schmelztemperatur als spezifische PCR-Produkte und können anhand dessen von ihnen unterschieden werden. Die Höhe des Peaks der Schmelzkurve lässt Rückschlüsse über die Menge des gebildeten Fragments zu.

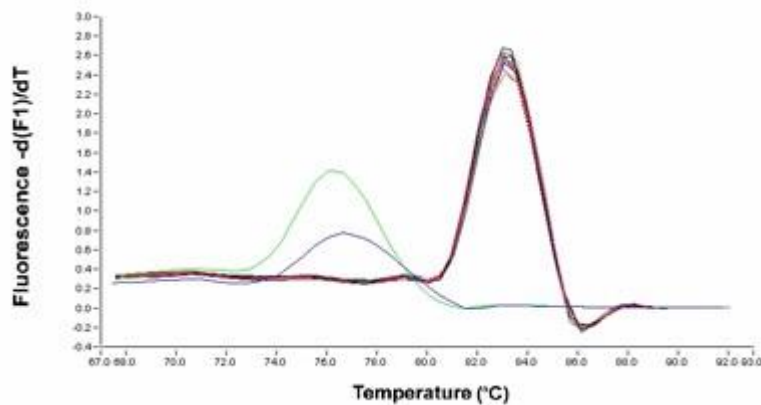


Abb. 9: Melting-curve-Darstellung eines Real-Time-PCR-Laufes: Deutlich zu erkennen sind zwei unterschiedlichen PCR-Produkte. Das spezifische mit der hohen Schmelztemperatur und sogenannte Primer-Dimer-Formationen mit einer niedrigeren T_m .

In unserer Versuchsreihe sollte mit dem Verfahren der Real-Time-PCR die Expression der Zielgene ermittelt werden. Dazu benötigt man neben deren Messung, die Quantifizierung von sog. Housekeeping-Genen (HKG). Als solches diene uns MHPRT (mouse Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase), das die Eigenschaften dieser Gene, wie beispielsweise Stabilität und ubiquitäre sowie Standardhomogene Expression, besitzt.

Durch den Relationsvergleich von HKG und Zielgen gelingt eine Standardisierung, durch die Fehlerquellen, wie sie durch Gewebe und Untersuchungsmethodik bei HKG und Zielgen gleichermaßen auftreten, vermieden werden. So gelingt es, in den folgenden Schritten der Expressionsunterschiedsberechnung, die individuellen Unterschiede der Proben zu relativieren.

Insgesamt untersuchten wir 6 Zielgene: TNF- α , IFN- γ , IL-12b als Vertreter der TH-1-gewichteten Immunantwort sowie TGF- β , IL-4 und IL-10 auf Seiten der TH-2-Antwort. Diese Methode ermöglichte uns eine vergleichende Untersuchung der Expression der unterschiedlichen Zytokine in den einzelnen Behandlungs- und Kontrollgruppen.

Für die einzelnen Primer musste zu Beginn der Real-Time-PCR die Erstellung von Standardkurven in verschiedenen Konzentrationsbereichen erfolgen.

Um eine Kontamination der Proben auszuschließen wird eine „no template control“ neben den Messungen des HKG und der Zielgene (NTC) angelegt, welche alle Reagenzien, außer cDNA, enthält. Dadurch kann eine mögliche Kontamination der Proben ausgeschlossen werden. Außerdem werden für jeden Primer Standardkurven in verschiedenen Konzentrationsbereichen und ein sog. „Blanc“ (SYBR-Green-Mix ohne c-DNA) zur Validierung erstellt. Die Protokolle der Real-Time-PCR entsprechen den Vorgaben der Firmen MWG-Biotech und Qiagen.

Chemikalien

- Aqua bidest

- Primer:

5'/3' MHPRT (mouse-Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase).

5'GGG GCT GTA CTG CTT AAC CAG '3

MWG-Biotech AG (Ebersberg, D)

TGF- β

F, 5'-TGA CGT CAC TGG AGT TGT ACG G-3',

R, 5'- GGT TCA TGT CAT GGA TGG TGC -3',

MWG-Biotech AG (Ebersberg, D)

TNF- α

Mm_Tnf_1_SG QuantiTect Primer Assay (200) (QT00104006)

Qiagen (Hilden, D)

IFN- γ

Mm_Ifng_1_SG QuantiTect Primer Assay (200) (QT01038821)

Qiagen (Hilden, D)

IL-4

Mm_Il4_1_SG QuantiTect Primer Assay (200) (QT00160678)

Qiagen (Hilden, D)

IL-10

Mm_Il10_1_SG QuantiTect Primer Assay (200) (QT00106169)

Qiagen (Hilden, D)

Material und Methoden

IL-12b

Mm_IL12b_1_SG QuantiTect Primer Assay (200) (QT00153643)
Qiagen (Hilden, D)

- SYBR-Green: QTM SYBR-Green Supermix, Biorad (München, D)

Geräte

- RT-Maschine

MJ-MiniTM (Personal Thermal Cycler)

Mini OpticonTM Real Time PCR, System; Biorad (München, D)

- Vortexer: Lab-Dancer, IKA-Werke GMBH & CO KG (Staufen, D)
- Zentrifuge: Biofuge fresco, Heraeus (Hanau, D)
- Zentrifuge: Minifuge T, Heraeus Sepatec (Berlin, D)

Durchführung

Es wird eine Verdünnung der cDNA auf 1:10 (2 µl cDNA + 18 µl Aqua bidest) erstellt. Der Mix aus SYBR-GreenTM, Primer und Aqua bidest setzt sich, je nach Primercharakter, wie folgt zusammen:

Einfacher Ansatz	BIOTECH-PRIMER	QIAGEN-PRIMER
SYBR-Green-Mix	12,5 µl	12,5 µl
PRIMER A	0,25 µl	2,5 µl
PRIMER B	0,25 µl	-
AQUA BIDESE	11,0 µl	9,0 µl

Nach Pipettierung des Mixes in Low Tube Strips (Bio-Rad, München, D) wird 1 µl der 1:10 verdünnten Probe hinzugefügt.

Nach Verschluss der Cups mit Flat Cap Strips (Bio-Rad, München, D) erfolgt die Zentrifugation für 1 Minute bei 800 Upm.

Vorgegebene Schemata der Mini Opticon™ wurden angewandt:

- | | | |
|---|--|-------------------------|
| 1 | Incubate 95°C 00:10:00 | initale Denaturierung |
| 2 | Incubate 95°C 00:00:15 | Denaturierung |
| 3 | Incubate 60°C 00:00:30 | Annealing (AT variabel) |
| 4 | Incubate 72°C 00:01:00 | Extension |
| 5 | Plate read | |
| 6 | Goto line to for 45 more times | |
| 7 | Melting Curve 55°C-90°C, read every 0,2°C, hold 00:00:02 | |
| 8 | Incubate at 15°C forever | |

3.5 Auswertung

3.5.1 Klinische Daten

Aufgrund der 2 verschiedenen Tierspezies galt es zunächst einen klinischen Hinweis auf einen unterschiedlichen Verlauf post instillationem zu gewinnen. Hierzu dienten das Gewicht der Tiere, der Tag der ersten Tumorpalpation sowie Vitalitätsszeichen der Mäuse. Diese 3 Parameter wurden über den gesamten Verlauf der Behandlungszeit beobachtet und gruppenspezifisch ausgewertet.

3.5.2 Ergebnisse der Real-Time-PCR

Hauptauswertungscharakteristika dieser Arbeit sind die in der Real-Time-PCR gewonnen Ergebnisse, die durch Vergleich der Zytokinexpression der einzelnen Gruppen einen Hinweis auf die Wirkung von therapeutisch eingesetzter immunistimulativer DNA nachweisen sollen.

Die zum PCR-Gerät (MJ-Mini™ (Personal Thermal Cycler), Mini Opticon™) zugehörige Software der Firma Biorad (München, D) stellte den ersten Pfeiler der Auswertung dar. In eigens erstellten Tabellen in Microsoft Excel® wurden die Ergebnisse vervollständigt.

Die Funktionsweise der Real-Time-PCR wurde bereits im Abschnitt 2.4.6 erklärt. Im Folgenden sind die für die Auswertung relevanten Zusatzklärungen beschrieben:

In den Proben soll die Häufigkeit eines unbekannten Templates bestimmt werden. Hierzu benötigt man den C(t)-Wert. Dieser sogenannte Threshold Cycle drückt diejenige Zykluszahl aus, bei der zum ersten Mal ein Anstieg der Fluoreszenz über eine zuvor festgelegte Schwelle erfasst wird. Bei Passieren dieses Levels befindet sich in allen Reaktionsgefäßen die gleiche Menge an neusynthetisierter RNA. In einem PCR System mit einer theoretisch optimalen Effizienz von 100% verdoppelt sich die RNA-Produktmenge und damit auch die erfasste Fluoreszenz, was Rückschlüsse auf die zu Beginn eingesetzte Templatmenge ermöglicht. So erreichen Proben mit hohem RNA-Anteil den C(t)-Wert deutlich schneller als solche mit geringerem.

Mathematisch ausgedrückt, gibt es demnach einen indirekten Bezug des C(t)-Wertes und dem Logarithmus des initial eingesetzten Templates. Unter Idealbedingungen kommt es so zu einer exponentiellen Verdopplung des PCR-Produktes in jedem Zyklus.

Die weiteren Schritte der Auswertung erfolgten mit der *Liviak-Methode*.

Durch diese Formel werden die unterschiedlichen C(t)-Werte in Bezug auf das Housekeeping-Gen untereinander auf ihre Genexpression hin verglichen.

Neben den C(t)-Werten spielt die während der Real-Time-PCR ermittelte Effizienz der Reaktion eine bedeutende Rolle. Zu Beginn der Versuche wurden daher Standardkurven angefertigt. Entsprechen die Effizienzen der weiteren Versuche den zuvor ermittelten, benötigt es keiner weiteren Standardkurven und die C(t)-Werte dienen der abschließenden Bestimmung der Genexpression.

Bei der PCR nutzten wir eine Dreifachbestimmung. Pro Primer und Housekeeping-Gen wurden allerdings nur je 2 Werte in die Auswertung miteinbezogen. Daraus ergibt sich eine Zahl von 14 Werten pro Tumor, die den Berechnungen dienen:

Primer	PCR-Ergebnisse pro Tumor (C(t))	Werte für Auswertung pro Tumor (C(t))
MHPRT	3	2
TGF- β	3	2
IL-4	3	2
IL-10	3	2
IL-12	3	2
TNF- α	3	2
IFN- γ	3	2
Anzahl gesamt	21	14

Bei einer Gesamtumoranzahl von 57 standen demnach, wie untenstehende Tabelle verdeutlicht, 798 Werte zur Auswertung zur Verfügung.

Tumoranzahl		PCR-Ergebnisse	Werte für Auswertung
rechts	38	798	532
links	19	399	266
gesamt	57	1197	798

Pro Gruppe stellt sich die Verteilung folgendermaßen dar:

Gruppe	PCR-Ergebnisse	Werte für Auswertung
Kontrollgruppe C57BL/6	210	140
Behandlungsgruppe C57BL/6	420	280
Kontrollgruppe C57BL/6 TLR-9 K.o.	189	126
Behandlungsgruppe C57BL/6 TLR-9 K.o.	378	252
Anzahl	1197	798

Material und Methoden

Die Mittelwerte der C(t)-Werte und Effizienzen der jeweiligen Gruppen sind in folgender Tabelle aufgeführt:

Gruppe	HKG (Konz.)	MW Effizienz	MW C(t)	Zielgen (Konz.)	MW Effizienz	MW C(t)
I	MHPRT (0,1)	90,76	22,57	TGF-β (0,1)	77,77	22,89
				IL-4 (0,1)	66,85	32,32
				IL-10 (0,1)	71,83	31,66
				IL-12 (0,1)	59,39	31,22
				IFN-γ (0,1)	74,91	25,75
				TNF-α (0,1)	64,87	24,01
II gesamt	MHPRT (0,1)	91,93	22,46	TGF-β (0,1)	80,21	23,12
				IL-4 (0,1)	68,77	32,12
				IL-10 (0,1)	74,57	30,55
				IL-12 (0,1)	70,24	30,54
				IFN-γ (0,1)	73,81	26,2
				TNF-α (0,1)	77,19	26,81
II rechts	MHPRT (0,1)	90,73	21,99	TGF-β (0,1)	81,87	22,85
				IL-4 (0,1)	71,71	31,78
				IL-10 (0,1)	75,79	29,8
				IL-12 (0,1)	70,04	30,24
				IFN-γ (0,1)	76,62	25,91
				TNF-α (0,1)	77,41	26,61
II links	MHPRT (0,1)	93,13	22,93	TGF-β (0,1)	78,55	23,39
				IL-4 (0,1)	66,12	32,42
				IL-10 (0,1)	73,34	31,3
				IL-12 (0,1)	70,44	30,85
				IFN-γ (0,1)	71,01	26,49
				TNF-α (0,1)	76,97	27,01

Material und Methoden

III	MHPRT (0,1)	64,51	23,33	TGF-β (0,1)	71,71	23,69
				IL-4 (0,1)	65,04	27,37
				IL-10 (0,1)	69,79	29,72
				IL-12 (0,1)	77,29	28,76
				IFN-γ (0,1)	69,03	28,79
				TNF-α (0,1)	74,58	27,62
IV gesamt	MHPRT (0,1)	71,96	23,95	TGF-β (0,1)	72,92	23,8
				IL-4 (0,1)	64,07	24,27
				IL-10 (0,1)	74,77	26,71
				IL-12 (0,1)	73,03	25,6
				IFN-γ (0,1)	75,63	26,96
				TNF-α (0,1)	72,65	25,78
IV rechts	MHPRT (0,1)	69,08	24,17	TGF-β (0,1)	73,66	23,75
				IL-4 (0,1)	64,16	23,93
				IL-10 (0,1)	74,68	26,63
				IL-12 (0,1)	69,05	25,24
				IFN-γ (0,1)	76,1	26,74
				TNF-α (0,1)	73,42	25,47
IV links	MHPRT (0,1)	75,03	23,78	TGF-β (0,1)	71,96	24,01
				IL-4 (0,1)	64,56	24,59
				IL-10 (0,1)	75,45	26,75
				IL-12 (0,1)	77,61	25,81
				IFN-γ (0,1)	75,3	27,07
				TNF-α (0,1)	72,41	25,82

I Kontrollgruppe C57BL/6

II Behandlungsgruppe C57BL/6

III Kontrollgruppe C57BL/6 TLR-9 K.o.

IV Behandlungsgruppe C57BL/6 TLR-9 K.o.

Die Auswertung erfolgte nun in 3 Schritten:

Errechnung von $\Delta C(t)$, $\Delta\Delta-C(t)$ und anschließende Anwendung der Liviak-Methode.

Als erstes erfolgte die Bezugnahme der einzelnen Zielgen- $C(t)$ -Werte mit dem Housekeeping-Gen, um eventuelle Unterschiede zu normieren. Hierzu diene folgende Formel:

$$\Delta C(t) = C(t)_{\text{Zielgen}} - C(t)_{\text{HKG}}$$

Diese Berechnungen wurden sowohl in Kontroll- als auch in Behandlungsgruppen durchgeführt.

Mit dem errechneten $\Delta C(t)$ konnte nun der $\Delta\Delta-C(t)$ -Wert bestimmt werden, der sich aus der Subtraktion des $\Delta C(t)$ der Kontrollgruppe vom $\Delta C(t)$ der Behandlungsgruppe errechnen lässt:

$$\Delta\Delta-C(t) = \Delta C(t)_{\text{Behandlungsgruppe}} - \Delta C(t)_{\text{Kontrollgruppe}}$$

Im letzten Schritt konnte der Expressionsunterschied der Zytokine in den einzelnen Gruppen ermittelt werden. Dazu verwendeten wir die bereits erwähnte *Liviak-Methode*:

$$\text{Expression (Zielgen)} = 2^{-\Delta\Delta-C(t)}$$

Das Ergebnis dieser Formel gibt den Faktor der Expression des Zielgens in der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe an. Es handelt sich um eine exponentielle Gleichung, weshalb eine Expression von 1 bedeutet, dass Zielgen und HKG in gleicher Menge exprimiert werden. Werte <1 zeigen eine verminderte Expression des Zielgens, Werte >1 eine erhöhte Expression zugunsten des Zielgens (Pfaffl, 2004).

4 Ergebnisse

Die Auswertung der im vorherigen Kapitel beschriebenen Versuche erfolgte an klinischen Gesichtspunkten sowie an mathematischen Berechnungen der in der PCR gewonnenen Daten. Hierzu war es unabdingbar, die Gruppen gemeinsam - und nicht die einzelnen Tiere - zu bewerten, da nur so ein Vergleich zwischen therapierten und nicht-therapierten Tieren festzustellen war.

Zu den Versuchen standen insgesamt 38 Tiere zur Verfügung. Die Aufteilung in den einzelnen Gruppen sah wie folgt aus:

Gruppe	Tier	Anzahl
Kontrollgruppe C57BL/6	1-10	10
Behandlungsgruppe C57BL/6	11-20	10
Kontrollgruppe C57BL/6 TLR-9 K.o.	36-44	9
Behandlungsgruppe C57BL/6 TLR-9 K.o.	45-53	9
Anzahl gesamt		38

Im ersten Teil dieses Kapitels soll die klinische Seite des Versuchaufbaus bewertet werden, gefolgt von der Auswertung der im experimentellen Teil erarbeiteten Daten.

4.1. Klinische Aspekte

Bedeutsame klinische Parameter stellten dar:

1. Vitalitätsverlauf
2. Gewichtsverlauf
3. Tag der ersten Tumorpalpation
4. Tumorgroße post sectionem

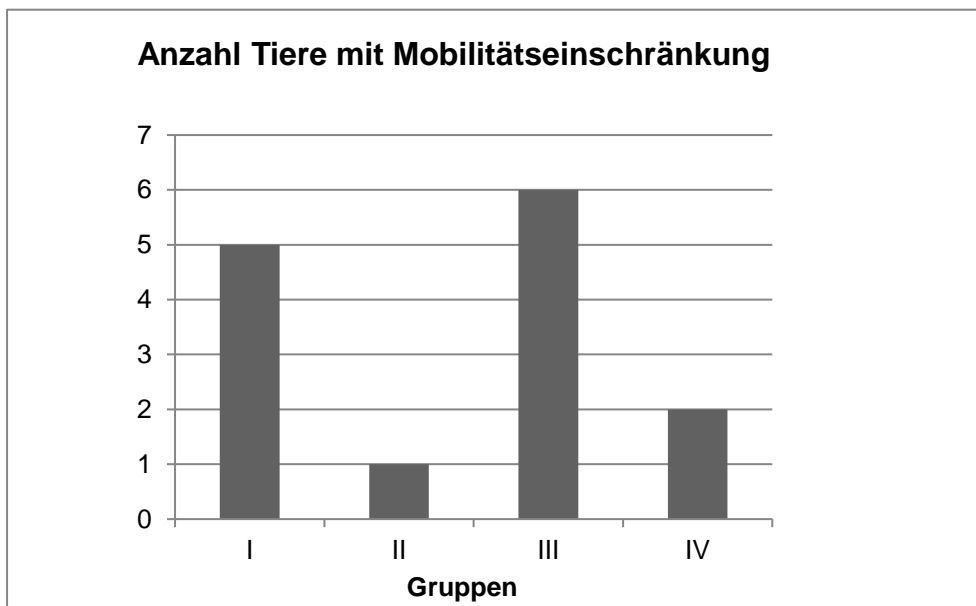
Über den Versuchszeitraum von 13 Tagen erfolgte die Beurteilung der Tiere.

Ergebnisse

4.1.1. Vitalitätsverlauf

Nahezu alle Tiere waren gleichen Alters und Gewichts und wiesen zu Beginn der Versuche keinerlei Krankheitszeichen auf. Während des Versuchszeitraums verstarb keines der Tiere, was für eine gute Ausgangsposition und Pflege, sowie ein gut terminiertes Ende der Experimente spricht.

Aufgrund der Tumorinstillation in die Flanken war bei einigen Mäusen zum Ende des Versuchszeitraumes eine erschwerte, hinkende Fortbewegung erkennbar – am ehesten vermutet durch Schmerzen bei infiltrativem Wachstum der Tumoren in die hintere Beinmuskulatur. Dies trat vor allem in den Kontrollgruppen der beiden Mausspezies auf, wie folgendes Diagramm verdeutlicht:



Diag.: Mobilitätseinschränkung der Tiere in allen Behandlungsgruppen.

(I = Kontrollgruppe C57BL/6, II = Behandlungsgruppe C57BL/6, III = Kontrollgruppe C57BL/6-TLR-9-Knock-out, IV = Behandlungsgruppe C57BL/6-TLR-9-Knock-out)

Die Narkose verlief bei allen Tieren problemlos, ebenso die Tumorzell- und die Oligonukleotid-Instillation. Lediglich bei 3 Tieren waren Ulzerationen an den Instillationsstellen zu finden. 2 der betroffenen Tiere gehörten der Behandlungsgruppe der TLR-9-Knock-out-Mäuse an.

Ergebnisse

Gruppe	Anzahl der Tiere mit Ulzerationen
Kontrollgruppe C57BL/6	1
Behandlungsgruppe C57BL/6	0
Kontrollgruppe C57BL/6 TLR-9 K.o.	0
Behandlungsgruppe C57BL/6 TLR-9 K.o.	2

Tab.: Anzahl der Tiere der einzelnen Gruppen mit Ulzerationen an den Instillationsstellen

4.1.2. Gewichtsverlauf

Die Tiere wurden über den gesamten Versuchszeitraum 4 Mal gewogen (Tag 0, 4, 8, 13). Das Ausgangsgewicht aller Tiere war ähnlich.

In untenstehender Tabelle finden sich die 4 Messdaten aller Gruppen, die in der folgenden Tabelle mittels der prozentualen Gewichts- zunahme oder -abnahme näher erläutert werden.

Tier	Gewicht (g)				Gewichtszu-/abnahme (%)
	Tag 0	Tag 4	Tag 8	Tag 13	
I	18,5	19,56	19,33	19,47	+5,24
II	18,62	20,05	20,03	20,47	+10
III	20,53	20,83	21,02	21,46	+4,53
IV	23,16	23,21	23,19	22,92	-1,04

Tab.: Gewichtsverlauf der 4 Versuchsgruppen über den gesamten Untersuchungszeitraum. (I = Kontrollgruppe C57BL/6, II = Behandlungsgruppe C57BL/6, III = Kontrollgruppe C57BL/6-TLR-9-Knock-out, IV = Behandlungsgruppe C57BL/6-TLR-9-Knock-out)

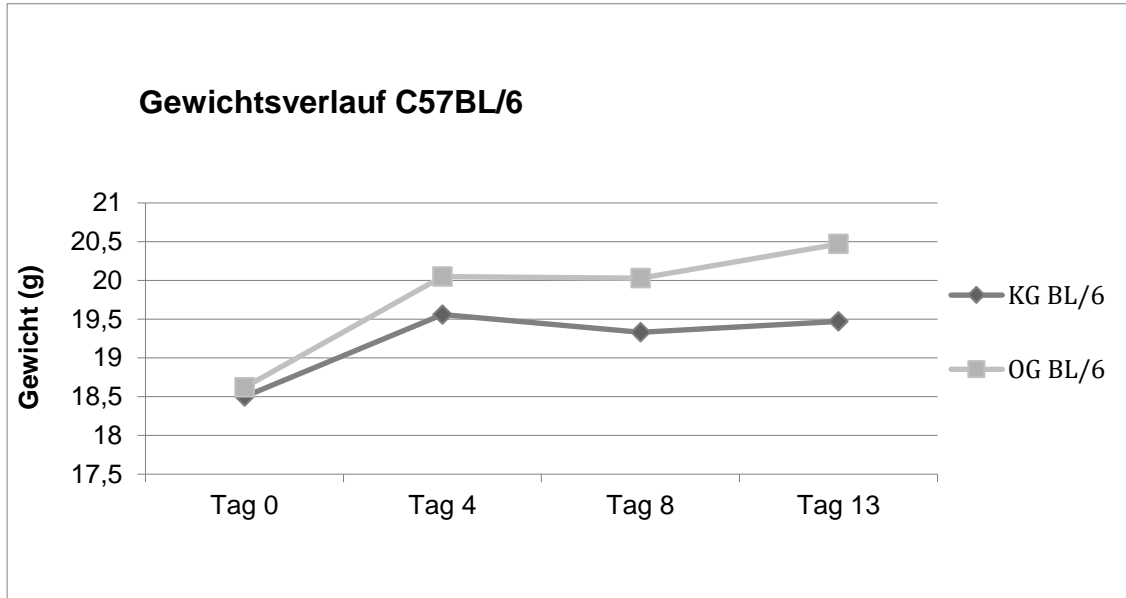
Ein geringer Gewichtsverlust von 1,04% zeigt sich lediglich in der Behandlungsgruppe der TLR-9-Knock-out-Mäuse. Unter Ihnen befanden sich auch wie bereits in 3.1.1 beschrieben zwei Tiere mit ulzerierenden Tumoren und einem schlechteren Allgemeinzustand am Ende der Versuchsreihe. Alle anderen 3 Gruppen nahmen durchschnittlich 6,59% (zwischen 4,53% und 10%) an Gewicht zu.

Betrachtet man die Gewichtsmessungen des ersten und letzten Tages der Tiere, so ist die oben beschriebene Tendenz des diskreten Gewichtsverlustes in der

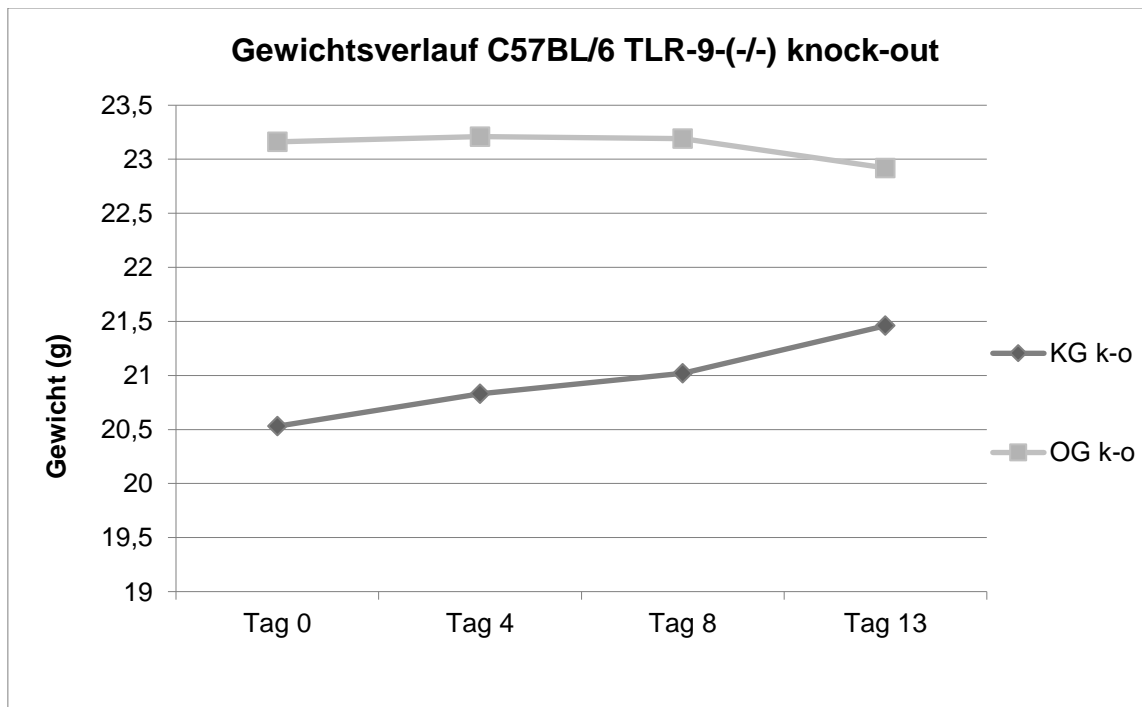
Ergebnisse

Behandlungsgruppe der Knock-out-Mäuse, sowie die Gewichtszunahme aller Tiere in den übrigen Gruppen erkennbar.

Betrachtet man den Gewichtsverlauf der 2 unterschiedlichen Mausspezies, erhält man folgende Darstellung:



Diag.: Gewichtsverlauf der Kontroll- und Behandlungsgruppe der C57BL/6-Mäuse (KG BL/6 = Kontrollgruppe C57BL/6, OG BL/6 = Behandlungsgruppe C57BL/6)



Diag.: Gewichtsverlauf der Kontroll-(KG) und Behandlungsgruppe (OG) der C57BL/6-TLR-9-Knock-out Mäuse

4.1.3 Tag der ersten Tumorpalpation

Als Maß für das Wachstum der Tumorzellen (MB 49) galt der Tag der ersten Palpation eines Tumors an der Infiltrationsstelle. Das schnellste Wachstum zeigte sich bei den Knock-out-Mäusen, bei denen durchschnittlich bereits am 5. Tag post instillationem eine grobkörnige, harte Raumforderung zu tasten war. Die beiden Behandlungsgruppen (II und IV) folgten den Kontrollgruppen jeweils 1-2 Tage später mit einem tastbaren Tumorwachstum (II = Tag 9,5; IV = Tag 6). Makroskopisch waren die subkutan wachsenden Tumoren gut durch eine Veränderung der Fellstruktur zu differenzieren.

4.1.4 Tumorgröße post sectionem

Nach der Gewinnung der Tumoren der Tiere wurden dieselben mit einer elektrischen Schiebelehre in 2 Ebenen vermessen (in mm). Um die Werte vergleichen zu können, wurde mittels der 2 Längenmaße die Fläche des Tumors (mm^2) bestimmt und hierdurch eine durchschnittliche Tumorgröße der einzelnen Gruppen ermittelt.

So zeigten sich die größten Tumorflächen in beiden Gruppen der TLR-9-Knock-out-Mäuse (Kontrollgruppe = $62,22 \text{ mm}^2$; Behandlungsgruppe = $55,26 \text{ mm}^2$), gefolgt von der Kontrollgruppe der C57BL/6-Mäuse mit einer Tumorgröße von $44,89 \text{ mm}^2$. Den durchschnittlich kleinsten Tumor wies die Behandlungsgruppe der C57BL/6-Mäuse mit nur $19,19 \text{ mm}^2$ auf.

Bei den Tumoren der Behandlungsgruppen wurden weiterhin die Größen der einzelnen Tumoren verglichen, da diesen Mäusen beidseits Tumorzellen instilliert wurden (bei nur rechtsseitiger Behandlung mit Oligonukleotiden). In der Behandlungsgruppe der TLR-9-Knock-out-Mäuse waren die Tumoren der linken Seite kleiner (rechts $59,54 \text{ mm}^2$ vs. links $50,98 \text{ mm}^2$).

In der Behandlungsgruppe der C57BL/6-Mäuse hingegen unterschieden sich die beidseitigen Tumoren nur minimal.

Ergebnisse

Gruppe	MW Tumor in mm ²		
	rechts	links	MW
Kontrollgruppe C57BL/6	44,89		
Behandlungsgruppe C57BL/6	19,19	19,72	19,455
Kontrollgruppe C57BL/6 TLR-9 K.o.	62,22		
Behandlungsgruppe C57BL/6 TLR-9 K.o.	59,54	50,98	55,26

Tab.: Durchschnittliche Tumorgroße in mm² der einzelnen Gruppen

4.1.5. Zusammenfassung der klinischen Daten

Eine Aussage über ein besseres Outcome der Tiere bei Behandlung mit immunstimulativer DNA soll anhand des vorangegangenen Kapitels den Tierspezies nach erfolgen:

C57BL/6-Mäuse

Bei allen aufgeführten klinischen Parametern ist ein deutlicher Unterschied zwischen der behandelten und nicht behandelten Gruppe dieser Mausspezies zu verzeichnen:

Während bei den mit Oligonukleotiden therapierten Tieren nur eines in der Mobilität eingeschränkt war, präsentierten sich in der Kontrollgruppe bereits 5 Tiere mit einer am wahrscheinlichsten durch das Tumorwachstum schmerzbedingten Fortbewegungseinschränkung. Bei der Darstellung des Gewichts zeigte sich bei der Behandlungsgruppe eine bessere Zunahme, als bei den Tieren der Kontrollgruppe. Der Tag der ersten Tumorpalpation war bei den mit CpG-ODN-therapierten Tieren im Durchschnitt Versuchstag 9, was im gesamten Versuchsablauf der späteste Zeitpunkt einer Palpation war. Als letzter Parameter wurde die Tumorgroße verglichen. Auch hier wurde in der Behandlungsgruppe der durchschnittlich kleinste Tumor gemessen.

C57BL/6-TLR-9-Knock-out-Mäuse

In Bezug auf Tumorgroße, Tag der ersten Tumorpalpation und Mobilitätseinschränkung waren auch in dieser Gruppe die behandelten Tiere der Kontrollgruppe überlegen. Allerdings zeigten sich im Versuchsverlauf bei 2 Tieren ulzerierende Tumoren und auch bei der Begutachtung des Gewichtes war es die mit CpG-ODN-therapierte Gruppe, bei der als einzige ein Gewichtsverlust zu verzeichnen war.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass beim Vergleich der beiden Tierspezies, die Gruppe der C57BL/6-Mäuse, die eine Therapie mit immunstimulativer DNA erhielt, ein deutlich besseres klinisches Outcome in Bezug auf Wachstumsgeschwindigkeit des Tumors, Tumorgroße und Vitalität aufwies als die unbehandelten Mäuse. Die Gruppe der C57BL/6-TLR-9-Knock-out-Mäuse zeigte ebenfalls bei Behandlung ein besseres Outcome, allerdings geringfügiger ausgeprägt.

4.2. Experimentelle Ergebnisse

Die zuvor bereits dargestellten Ergebnisse der Real-Time-PCR dienten der weiteren Auswertung. Hierbei war es wichtig, die Mittelwerte der einzelnen Gruppen zu ermitteln, um diese miteinander vergleichen zu können.

Ziel der Berechnungen war der Faktor der Genexpression der 6 untersuchten Zielgene: IL-12, TGF- β und IFN- γ als Vertreter der TH-1- sowie IL-4, IL-10 und TNF- α als Repräsentanten der TH-2-gewichteten Immunantwort.

Zunächst erfolgt eine tabellarische Aufstellung der in der PCR gewonnenen Ergebnisse der 4 verschiedenen Gruppen. Anschließend erfolgt die Darstellung der Zielgenexpression der einzelnen Gruppen, die dann im letzten Teil dieses Abschnittes verglichen werden.

Ergebnisse

4.2.1. Ergebnisse der Real-Time-PCR

Nach Gruppen angeordnet finden sich in der untenstehenden Tabelle die Mittelwerte der für die weiteren Berechnungen wichtigen C(t)-Werte und Effizienzen.

Aufgelistet sind die Daten sowohl für das Housekeeping-Gen MHPRT, als auch für die 6 unterschiedlichen Zytokine.

Die Gruppen sind folgendermaßen benannt:

- I Kontrollgruppe C57BL/6
- II Behandlungsgruppe C57BL/6
- III Kontrollgruppe C57BL/6 TLR-9 K.o.
- IV Behandlungsgruppe C57BL/6 TLR-9 K.o.

Bei den Behandlungsgruppen ist zusätzlich eine seitengetrennte Aufstellung der Daten aufgeführt.

Gruppe	HKG (Konz.)	MW Effizienz	MW C(t)	Zielgen (Konz.)	MW Effizienz	MW C(t)
I	MHPRT (0,1)	90.76	22.57	TGF-β (0,1)	77.77	22.89
				IL-4 (0,1)	66.85	32.32
				IL-10 (0,1)	71.83	31.66
				IL-12 (0,1)	59.39	31.22
				IFN-γ (0,1)	74.91	25.75
				TNF-α (0,1)	64.87	24.01
II gesamt	MHPRT (0,1)	91.93	22.46	TGF-β (0,1)	80.21	23.12
				IL-4 (0,1)	68.77	32.12
				IL-10 (0,1)	74.57	30.55

Ergebnisse

				IL-12 (0,1)	70.24	30.54
				IFN-γ (0,1)	73.81	26.2
				TNF-α (0,1)	77.19	26.81
II rechts	MHPRT (0,1)	90.73	21.99	TGF-β (0,1)	81.87	22.85
				IL-4 (0,1)	71.71	31.78
				IL-10 (0,1)	75.79	29.8
				IL-12 (0,1)	70.04	30.24
				IFN-γ (0,1)	76.62	25.91
				TNF-α (0,1)	77.41	26.61
II links	MHPRT (0,1)	93.13	22.93	TGF-β (0,1)	78.55	23.39
				IL-4 (0,1)	66.12	32.42
				IL-10 (0,1)	73.34	31.3
				IL-12 (0,1)	70.44	30.85
				IFN-γ (0,1)	71.01	26.49
				TNF-α (0,1)	76.97	27.01
III	MHPRT (0,1)	64.51	23.33	TGF-β (0,1)	71.71	23.69
				IL-4 (0,1)	65.04	27.37
				IL-10 (0,1)	69.79	29.72
				IL-12 (0,1)	77.29	28.76
				IFN-γ (0,1)	69.03	28.79
				TNF-α (0,1)	74.58	27.62
IV gesamt	MHPRT (0,1)	71.96	23.95	TGF-β (0,1)	72.92	23.8
				IL-4 (0,1)	64.07	24.27
				IL-10 (0,1)	74.77	26.71
				IL-12 (0,1)	73.03	25.6
				IFN-γ (0,1)	75.63	26.96
				TNF-α (0,1)	72.65	25.78

Ergebnisse

IV rechts	MHPRT (0,1)	69.08	24.17	TGF-β (0,1)	73.66	23.75
				IL-4 (0,1)	64.16	23.93
				IL-10 (0,1)	74.68	26.63
				IL-12 (0,1)	69.05	25.24
				IFN-γ (0,1)	76.1	26.74
				TNF-α (0,1)	73.42	25.47
IV links	MHPRT (0,1)	75.03	23.78	TGF-β (0,1)	71.96	24.01
				IL-4 (0,1)	64.56	24.59
				IL-10 (0,1)	75.45	26.75
				IL-12 (0,1)	77.61	25.81
				IFN-γ (0,1)	75.3	27.07
				TNF-α (0,1)	72.41	25.82

Tab.: Mittelwerte der in der PCR gewonnenen C(t)-Werte und Effizienzen aller Gene (mit der in der PCR eingesetzten Konzentration (Konz.)). Die Daten sind den einzelnen 4 Gruppen sowie der Tumorlokalisation nach zusammengefasst.

4.2.2. Expressionsfaktoren der Zielgene

Mittels der errechneten Durchschnittswerte konnten die bereits im Kapitel 3.2. erläuterten weiteren Schritte zur Bestimmung des Expressionsfaktors der Zielgene vorgenommen werden.

Hierzu mussten zu Beginn der $\Delta C(t)$ -Wert und anschließend durch Anwendung der Liviak-Methode die Expressionsunterschiede errechnet werden.

Dazu benötigt man die gruppenspezifisch zusammengefassten Werte. Durch Subtraktion des $\Delta C(t)$ -Wertes der Kontrollgruppe von der Behandlungsgruppe entsteht $\Delta\Delta C(t)$, aus dem der Faktor der Genexpression abzuleiten ist.

Es ist zu beachten, dass dieser errechnete Wert ($2^{-\Delta\Delta C(t)}$) den Faktor der Genexpression der Behandlungsgruppe in Bezug auf die Kontrollgruppe ausdrückt. So zeigen erst Faktoren >1 eine Mehrfachexpression der entsprechenden Gene an, wohingegen Faktoren <1 Hinweis für eine

Ergebnisse

Minderexpression des Genmaterials in der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe sind.

In dieser Arbeit wurden die Expressionen der einzelnen Gene innerhalb der 2 Tierspezies verglichen. Die Trennung der Gene nach Induktion der Immunantwort (TH-1- oder TH-2-) spielte hierbei eine wichtige Rolle. Da außerdem die CpG-ODN-Stimulation lokal und/oder systemisch untersucht werden soll, sind neben der Darstellung der gesamten Tumoranzahl der einzelnen Gruppen und deren Genexpression auch die Ergebnisse der rechten und linken Tumoren getrennt voneinander aufgeführt.

4.2.2.1. $\Delta C(t)$ -, $\Delta\Delta C(t)$ - und $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ –Wert der C57BL/6-Mausspezies

Nachfolgende Tabelle stellt die Genexpression der einzelnen Zytokine in der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe der C57BL/6-Mäuse dar. In folgender Darstellung wurde die Gesamtzahl der Tumoren (rechts und links) in die Berechnungen einbezogen. Im Anschluß werden die Daten seitenspezifisch demonstriert.

Ergebnisse

Zuordnung	Zielgen	$\Delta\text{-c(t) I}$	$\Delta\text{-c(t) II gesamt}$	$\Delta\Delta\text{-c(t)}$	$2^{-\Delta\Delta\text{-C(t)}}$
TH-1- Zytokine	TNF-α	1,44	4,35	2,91	0,13
	IFN-γ	3,12	3,74	0,56	0,68
	IL-12b	8,65	8,09	-0,56	1,48
TH-2- Zytokine	TGF-β	0,32	0,67	0,35	0,78
	IL-4	9,75	9,67	-0,09	1,06
	IL-10	9,09	8,09	-1,0	1,99

Tab.: Darstellung der Genexpression der einzelnen Zielgene in den Gruppen der C57BL/6-Tiere (I = Kontrollgruppe C57BL/6, II = Behandlungsgruppe C57BL/6)

In den Gruppen der C57BL/6-Mäuse fand sich vor allem bei der mit stimulativen Oligonukleotiden behandelten Gruppe eine Mehrfachexpression der TH-2-Zytokine. Vor allem IL-10 wurde nahezu 2-fach exprimiert (1,99), gefolgt von IL-4 (1,06). TGF- β fand sich im Vergleich zur Kontrollgruppe minderexprimiert mit einem Faktor von 0,78.

Auf Seiten der TH-1-gewichteten Immunantwort stellte sich in dieser Gruppe lediglich bei IL-12b eine im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhte Expression mit dem Faktor 1,48 heraus. TNF- α wurde mit einem Faktor von 0,13 deutlich weniger exprimiert, ebenso IFN- γ (0,68).

Ergebnisse

Zuordnung	Zielgen	$\Delta\text{-c(t) I}$	$\Delta\text{-c(t) II rechts}$	$\Delta\Delta\text{-c(t)}$	$2^{-\Delta\Delta\text{-C(t)}}$
TH-1- Zytokine	TNF-α	1,44	4,62	3,17	0,11
	IFN-γ	3,18	3,92	0,74	0,6
	IL-12b	8,65	8,25	-0,4	1,31
TH-2- Zytokine	TGF-β	0,32	0,87	0,55	0,68
	IL-4	9,75	9,86	0,10	0,93
	IL-10	9,09	7,82	-1,27	2,42

Tab.: Darstellung der Genexpression der einzelnen Zielgene im rechten Tumormaterial der C57BL/6-Tiere (I = Kontrollgruppe C57BL/6, II = Behandlungsgruppe C57BL/6)

Bei den Ergebnissen der Genexprimierung der behandelten Tumoren rechtsseitig fällt der Expressionsfaktor des Zytokins IL-10 besonders auf. Als einziger in der Gruppe der TH-2-vermittelten Immunantwort ist er mit einem Faktor von 2,42 erhöht und steht IL-12b der TH-1-Antwort mit einem Expressionsfaktor von 1,31 gegenüber. Alle übrigen Zytokine werden hier vermindert exprimiert.

Ergebnisse

Zuordnung	Zielgen	$\Delta\text{-c(t) I}$	$\Delta\text{-c(t) II links}$	$\Delta\Delta\text{-c(t)}$	$2^{-\Delta\Delta\text{-C(t)}}$
TH-1- Zytokine	TNF-α	1,44	4,35	2,91	0,13
	IFN-γ	3,18	3,56	0,56	0,68
	IL-12b	8,65	7,92	-0,73	1,66
TH-2- Zytokine	TGF-β	0,32	0,46	0,15	0,90
	IL-4	9,75	9,5	-0,26	1,2
	IL-10	9,09	8,37	-0,72	1,64

Tab.: Darstellung der Genexpression der einzelnen Zielgene im linken Tumormaterial der C57BL/6-Tiere (I = Kontrollgruppe C57BL/6, II = Behandlungsgruppe C57BL/6)

Die linken Tumoren der mit CpG-behandelten Tiere weisen bei der TH-2-vermittelten Immunantwort sowohl bei IL-4 als auch bei IL-10 gesteigerte Genexpressionen auf. Bei den Zytokinen der TH-1-gewichteten Reaktion ist hier lediglich bei IL-12 eine vermehrte Genexpression mit einem Faktor von 1,66 zu sehen.

4.2.2.2. $\Delta\text{C(t)}$ -, $\Delta\Delta\text{-C(t)}$ - und $2^{-\Delta\Delta\text{-C(t)}}$ –Wert der C57BL/6-TLR-9-Knock-out-Mausspezies

Im Folgenden wird der Faktor der Genexpression der einzelnen Zytokine der Knock-out-Tierspezies tabellarisch und in Form von einem Diagramm vorgestellt und erläutert.

Ergebnisse

Zuordnung	Zielgen	$\Delta\text{-c(t) III}$	$\Delta\text{-c(t) IV gesamt}$	$\Delta\Delta\text{-c(t)}$	$2^{-\Delta\Delta\text{-C(t)}}$
TH-1- Zytokine	TNF-α	4,29	1,55	$\Delta\text{-2,74}$	6,68
	IFN-γ	5,46	3,01	$\Delta\text{-2,45}$	5,45
	IL-12b	5,42	1,65	$\Delta\text{-3,77}$	13,65
TH-2- Zytokine	TGF-β	0,36	$\Delta\text{-0,16}$	$\Delta\text{-0,51}$	1,43
	IL-4	4,03	0,32	$\Delta\text{-3,72}$	13,15
	IL-10	3,22	2,76	$\Delta\text{-0,47}$	1,38

Tab.: Darstellung der Genexpression der einzelnen Zielgene in den Gruppen der C57BL/6-TLR-9-Knock-out-Tiere (II = Kontrollgruppe C57BL/6 TLR-9-Knock-out, III = Behandlungsgruppe C57BL/6 TLR-9-Knock-out)

In den Gruppen der Knock-out-Mäuse zeigten sich bei allen Zytokinen der TH-1- und auch TH-2-stimulierten Reaktion in der Behandlungsgruppe im Vergleich zur nicht therapierten Kontrollgruppe eine erhöhte Genexpression.

Vor allem die Zielgene der TH-1-vermittelten Immunantwort wurden deutlich vermehrt exprimiert: IL-12b zeigte eine 13,65-fach erhöhte Expression, gefolgt von TNF- α (6,68) und IFN- γ (5,45).

Auch die Zytokine der TH-2-Antwort erreichten einen Mehrfachexpressionfaktor von 13,15 bei IL-4, 1,43 bei TGF- β und 1,38 bei IL-10.

Ergebnisse

Zuordnung	Zielgen	$\Delta\text{-c(t)}$ III	$\Delta\text{-c(t)}$ IV rechts	$\Delta\Delta\text{-c(t)}$	$2^{-\Delta\Delta\text{-C(t)}}$
TH-1-Zytokine	TNF-α	4,29	0.75	\sim-3,54	11.62
	IFN-γ	5,46	2.57	\sim-2,89	7.41
	IL-12b	5,42	1.08	\sim-4,35	20.34
TH-2-Zytokine	TGF-β	0,36	\sim -0,42	\sim-0,77	1.71
	IL-4	4,03	\sim -0,23	\sim-4,27	19.26
	IL-10	3,22	2.46	\sim-0,77	1.7

Tab.: Darstellung der Genexpression der einzelnen Zielgene im rechten Tumormaterial der C57BL/6-TLR-9-K.o.-Tiere (III = Kontrollgruppe C57BL/6-TLR-9-K.o., IV = Behandlungsgruppe C57BL/6-TLR-9-K.o.)

Ergebnisse

Zuordnung	Zielgen	$\Delta\text{-c(t) III}$	$\Delta\text{-c(t) IV links}$	$\Delta\Delta\text{-c(t)}$	$2^{-\Delta\Delta\text{-C(t)}}$
TH-1-Zytokine	TNF-α	4,29	2.04	\sim-2,25	4.76
	IFN-γ	5,46	3.29	\sim-2,17	4.5
	IL-12b	5,42	2.02	\sim-3,4	10.57
TH-2-Zytokine	TGF-β	0,36	0.23	\sim-0,13	1.09
	IL-4	4,03	0.8	\sim-3,23	9.39
	IL-10	3,22	2.97	\sim-0,25	1.19

Tab.: Darstellung der Genexpression der einzelnen Zielgene im linken Tumormaterial der C57BL/6-TLR-9-K.o.-Tiere (III = Kontrollgruppe C57BL/6-TLR-9-K.o., IV = Behandlungsgruppe C57BL/6-TLR-9-K.o.)

Im Seitenvergleich der Zytokinexpressionen der Tumorgewebe ist die deutlich gesteigerte Zytokinexprimierung der rechtsseitigen Tumoren zu beachten. Hier stehen sich am Beispiel von IL-12 Faktoren von 20,34 rechts und 10,57 links gegenüber.

Ergebnisse

4.2.3. Ergebnisse des Tumorgewebes (gesamt)

Zuerst sollen hier die unterschiedlichen Genexpressionen in den einzelnen Gruppen dargestellt werden, und folgend - ihrer Immunantwort zugehörig - miteinander verglichen werden.

4.2.3.1. Zytokinexpressionsfaktoren

C57BL/6-Tiere

Wie in untenstehender Tabelle ersichtlich, findet sich in der Behandlungsgruppe der C57BL/6-Tiere eine Mehrfachexpression der Zytokine IL-4 und IL-10 als Vertreter der TH-2-gewichteten und IL-12 für die TH-1-gewichtete Immunantwort. Die übrigen Zytokine werden alle im Vergleich zur Kontrollgruppe minderexprimiert (Expressionsfaktor <1).

Expressionsfaktoren	TGF- β	IL-4	IL-10	IL-12	IFN- γ	TNF- α
C57BL/6	0.79	1.06	1.99	1.48	0.68	0.13

Tab.: Expressionsfaktoren der Kontrollgruppe (C57BL/6-Mäuse) aller getesteten Zytokine

C57BL/6-TLR-9-Knock-out-Tiere

Bei den Knock-out-Mäusen präsentiert sich die Genexprimierung wie folgt: Bei allen getesteten Zytokinen konnte eine Mehrfachexpression von Faktoren (im Fall von IL-4 und IL-12 sogar > 13) nachgewiesen werden. Deutlich gesteigert zeigen sich die Exprimierungen insbesondere der Zytokine der TH-1-Immunantwort.

Ergebnisse

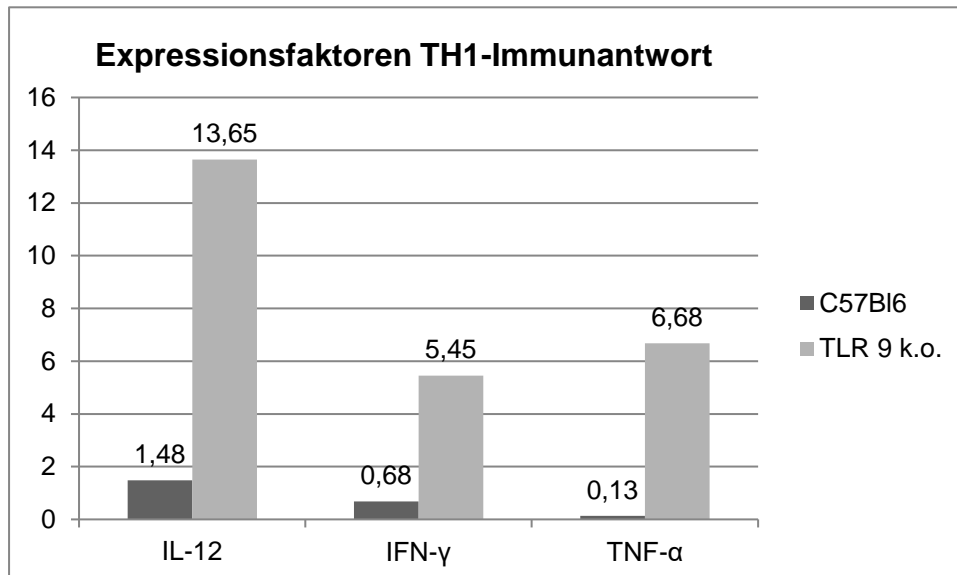
Expressionsfaktoren						
	TGF- β	IL-4	IL-10	IL-12	IFN- γ	TNF- α
C57BL/6-TLR-9-k.o.	1.43	13.15	1.38	13.65	5.45	6.68

Tab.: Expressionsfaktoren der TLR-9-Knock-out-Mäuse aller getesteten Zytokine

Im Folgenden soll die Aufteilung der Zytokine ihrer Immunstimulation nach (TH-1 vs. TH-2) genauer betrachtet und die Gruppen der C57BL/6 und der Knock-out-Mäuse dabei detaillierter verglichen werden. Dies geschieht zunächst am gesamten Tumorgewebe und im Anschluß seitenspezifisch (rechts und links).

TH-1-gewichtete Immunantwort

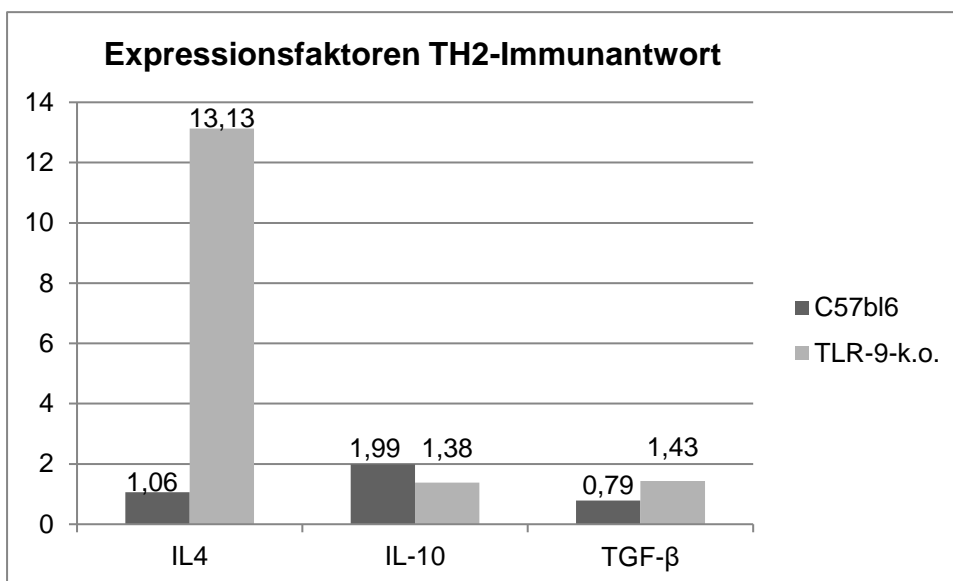
Wie bereits aus den vorangehenden Tabellen ersichtlich, ist die TH-1-gewichtete Immunstimulation bei den Knock-out-Mäusen deutlich höher. So stehen sich bei IL-12 beispielsweise Expressionsfaktoren von 1,48 bei den C57BL/6-Tieren und 13,65 bei den TLR-9-Knock-out-Mäusen gegenüber. Bei IFN- γ sind es Werte von 0,68 und 5,45 und bei TNF- α zeigen sich Expressionsunterschiede von 0,13 und 6,68.



Diag.: Expressionsfaktoren der TH-1-Zytokine des gesamten Tumormaterials beider Mausspezies

TH-2-gewichtete Immunantwort

Auch bei den Zytokinen der TH-2-gewichteten Immunantwort zeigt das Tumorgewebe der TLR-9-knock-out-Mäuse durchschnittlich eine erhöhte Genexpression. Lediglich IL-10 stellt eine Ausnahme dar. Hier präsentiert das Gewebe der C57BL/6-Tiere einen Mehrexpressionsfaktor von 1,99 im Gegensatz zu 1,38 bei der Knock-out-Spezies. Die Verteilungsmuster der beiden anderen Zytokine sehen wie folgt aus: IL-4 wurde bei den Knock-out-Tieren in der Behandlungsgruppe 13,15-fach höher als in deren Kontrollgruppe exprimiert, wobei sich in der Behandlungsgruppe der C57BL/6-Mäuse keine wesentliche Mehrexprimierung zeigte. Ein ähnliches Verhältnis zeigt sich bei TGF- β , bei dem sich Werte von 1,43 bei den Knock-out-Mäusen und 0,79 bei den C57BL/6-Tieren gegenüberstehen.



Diag.: Darstellung der TH-2-gewichteten Immunantwort vermittelnden Zytokine

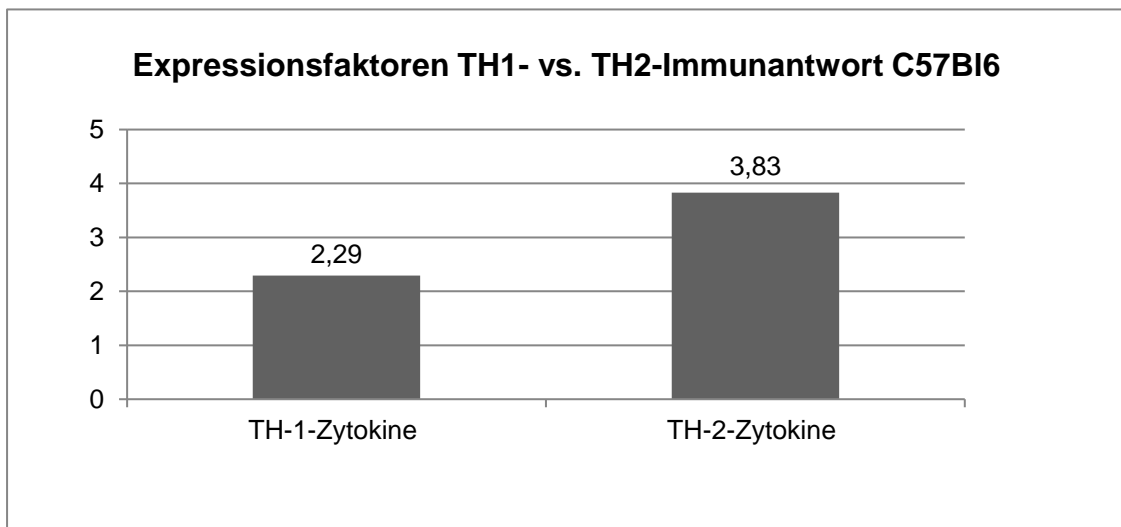
TH-1- versus TH-2-gewichtete Immunantwort

Um die Expressionsfaktoren der TH-1- und der TH-2-Immunantwort vergleichen zu können, wurde der Mittelwert aus den jeweiligen Zytokin-Expressionsfaktoren ermittelt.

Ergebnisse

Für den durchschnittlichen Expressionsfaktor der TH-1-gewichteten Immunstimulation zählen die Werte der Zytokine IL-12, IFN- γ und TNF- α , für den der TH-2-gewichteten Antwort die der Zytokine IL-4, IL-10 und TGF- β .

Das folgende Säulendiagramm soll die Expression der TH-1- und TH-2-Immunantwort zugehörigen Zytokine in der Gruppe der C57BL/6-Mäuse verdeutlichen:

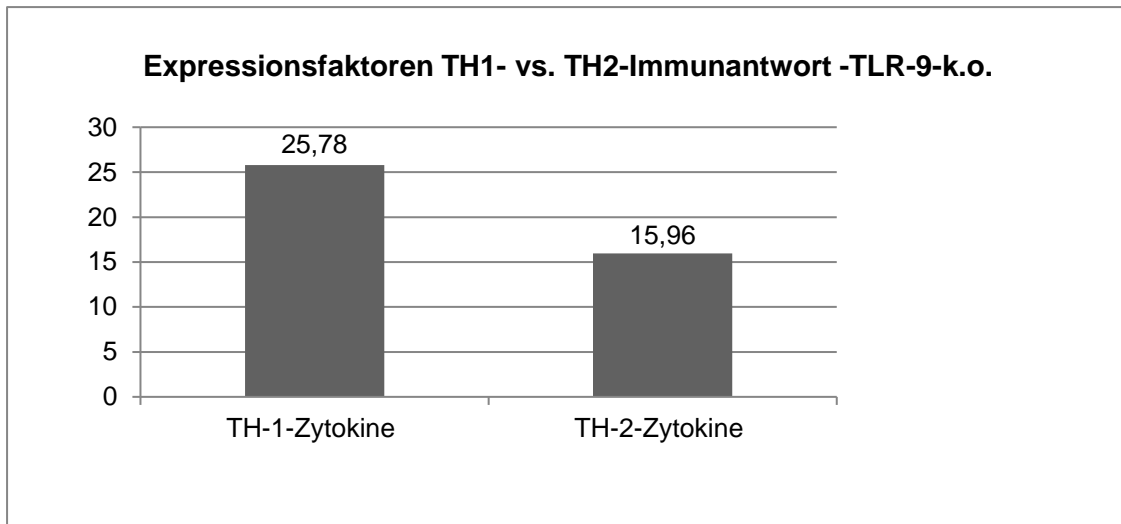


Diag.: Vergleichende Darstellung der TH1 und TH-2-gewichteten Immunantwort vermittelnden Zytokine der C57BL/6-Mausspezies

Bei den Tieren der C57BL/6-Mäuse zeigt sich eine deutliche Mehrfachexpression der Zytokine der TH-2-vermittelten Immunantwort.

Bei den Tieren der TLR-9-Knock-out-Gruppe sieht der Vergleich der Expressionsfaktoren der jeweiligen Immunantwort wie folgt aus:

Ergebnisse



Diag.: Vergleichende Darstellung der TH1 und TH2-gewichteten Immunantwort vermittelnden Zytokine der TLR-9-Knock-out-Mausspezies

Es zeigt sich eine deutlich vermehrte Genexpression der TH-1- assoziierten Zytokine im Gegensatz zur Gruppe der C57BL/6-Mäuse. Bei der TH-1-gewichteten Immunantwort kommt es hier zu maximalen Genexpressionsfaktoren von 8,59; bei der TH-2-getriggerten Antwort bilden die zuständigen Zytokine in dieser Gruppe durchschnittliche Expressionsfaktoren von 5,32.

Nach der Darstellung der Expressionsfaktoren in den Gesamtgruppen soll nun der Vergleich der bei den Behandlungsgruppen induzierten Tumoren rechts und links erfolgen. Erinnerung ist zu erwähnen, dass die Oligonukleotide lediglich rechtsseitig instilliert wurden.

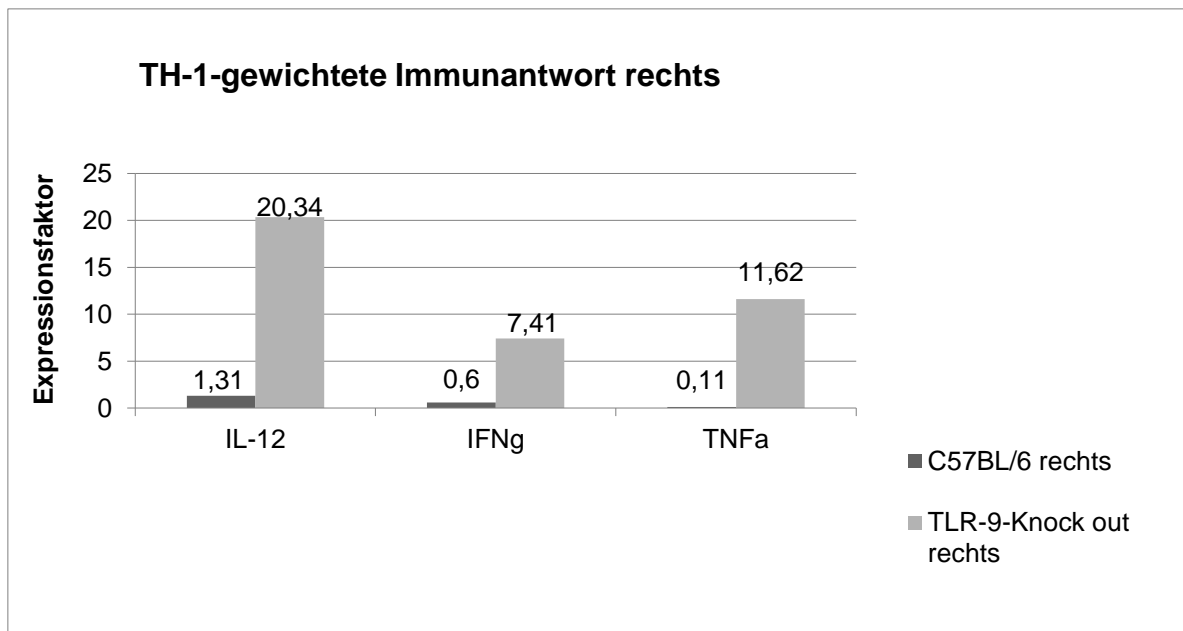
4.2.4. Ergebnisse der Tumoren rechts

TH-1-gewichtete Immunantwort rechts

Im untenstehenden Diagramm ist erneut eine durchschnittlich stark gesteigerte Expression bei den Tieren der Knock-out-Spezies zu sehen. Alle Zytokine der TH-1-gewichteten Immunantwort zeigen in den Behandlungsgruppen eine

Ergebnisse

gesteigerte Genexprimierung. Am deutlichsten zeigt sich der Unterschied bei IL-12, das in der Behandlungsgruppe der Knock-out-Tiere 20,34-fach, in der Behandlungsgruppe der C57BL/6-Gruppe lediglich 1,31-fach im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen exprimiert wird. Mehr noch weisen IFN- γ und TNF- α bei den C57BL/6-Mäusen sogar eine verminderte Expression auf (IFN- γ = 0,6 und TNF- α = 0,11). Bei den TLR-9-Knock-out-Mäusen hingegen zeigen auch eben genannte Zytokine eine um den Faktor 7 bis 12-fach erhöhte Expression (IFN- γ = 7,41 und TNF- α = 11,62).



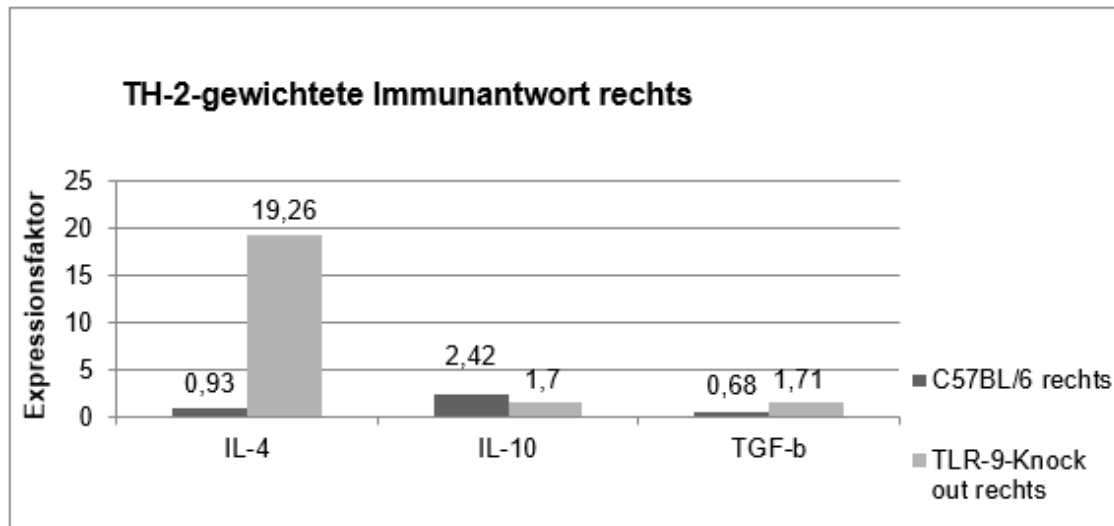
Diag.: Darstellung der TH-1-gewichteten Immunantwort vermittelnden Zytokine am Beispiel des rechten Tumorgewebes der C57BL/6-Mäuse

TH-2-gewichtete Immunantwort rechts

Vergleichbar mit dem Schaubild des gesamten Tumormaterials zeigt sich auch hier eine deutliche Mehrexpression des Zytokins IL-4 bei den behandelten Tieren der Knock-out-Gruppe. Bei diesem Beispiel treten Expressionsunterschiede von 0,93 – sprich eine Minderexprimierung – bei den C57BL/6-Mäusen und 19,26 als Zeichen einer hohen Mehrfachexpression in der Gruppe der Knock-out-Tiere auf.

Ergebnisse

IL-10 wird von beiden Mausspezies gering vermehrt exprimiert, wobei ein diskret höherer Wert bei den C57BL/6-Tieren gemessen werden konnte (C57BL/6 = 2,42; C57BL/6 TLR-9-K-o = 1,7). TGF- β zeigt bei den C57BL/6-Tieren eine verminderte (0,68), bei den Knock-out-Mäusen eine diskret vermehrte Expression mit dem Faktor 1,71.

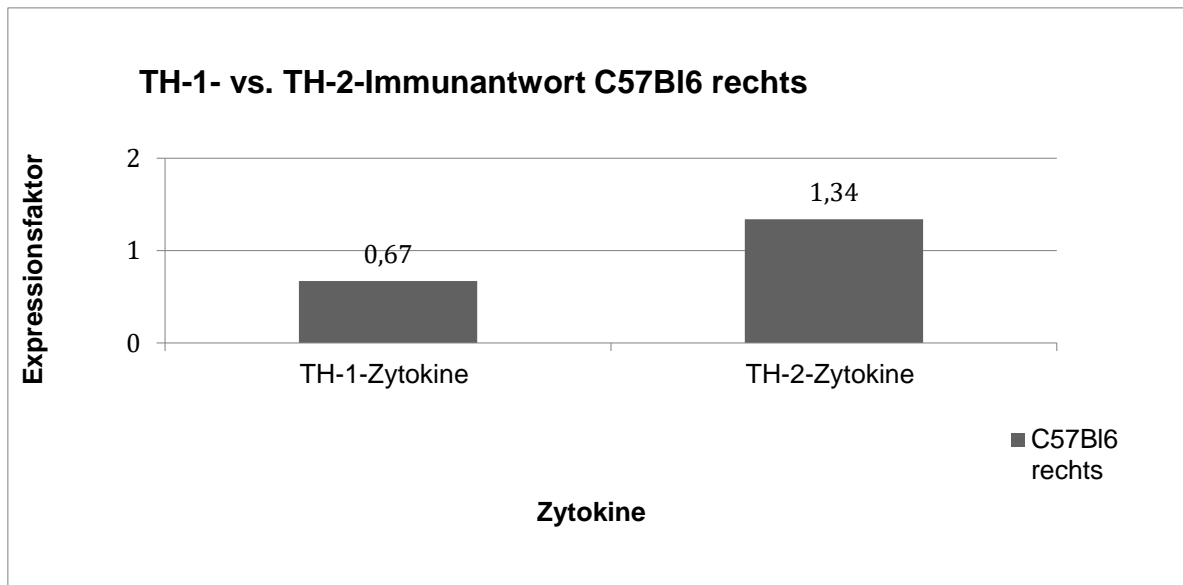


Diag.: Darstellung der TH-2-gewichteten Immunantwort vermittelnden Zytokine am Beispiel des rechten Tumorgewebes der C57BL/6-Mäuse

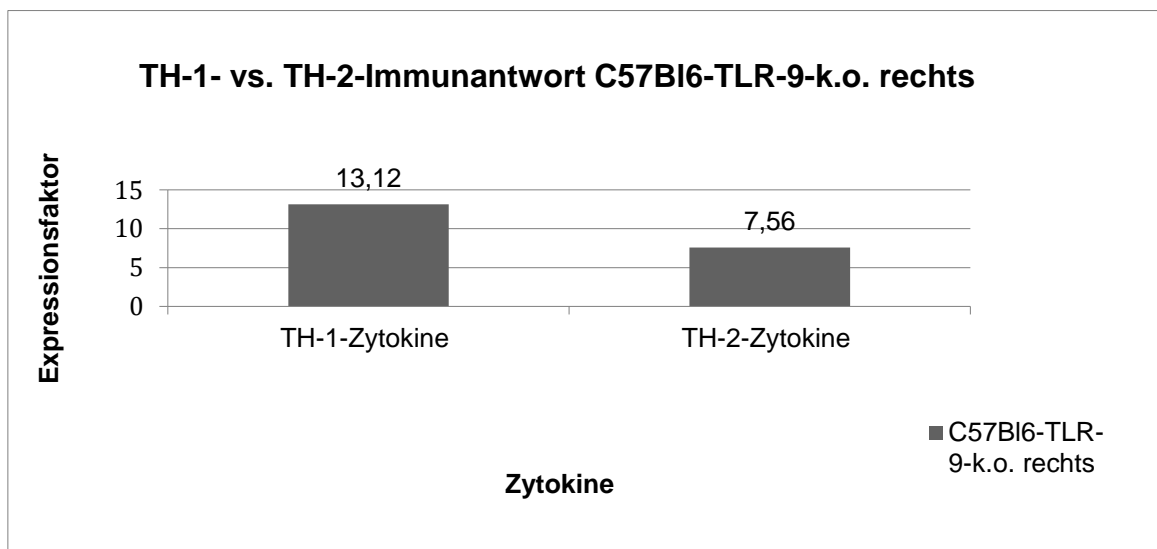
TH-1- versus TH-2-gewichtete Immunantwort des rechten Tumorgewebes

Folgende Tabellen zeigen das Verhältnis der Genexpressionsfaktoren der TH-1- und TH-2-gewichteten Immunantwort am Beispiel des rechtsseitigen Tumorgewebes.

Ergebnisse



Diag.: Vergleichende Darstellung der Immunantworten des rechten Tumorgewebes der C57BL/6-Mauspezies



Diag.: Vergleichende Darstellung der Immunantworten des rechten Tumorgewebes der C57BL/6-TLR-9-knock-out Mauspezies

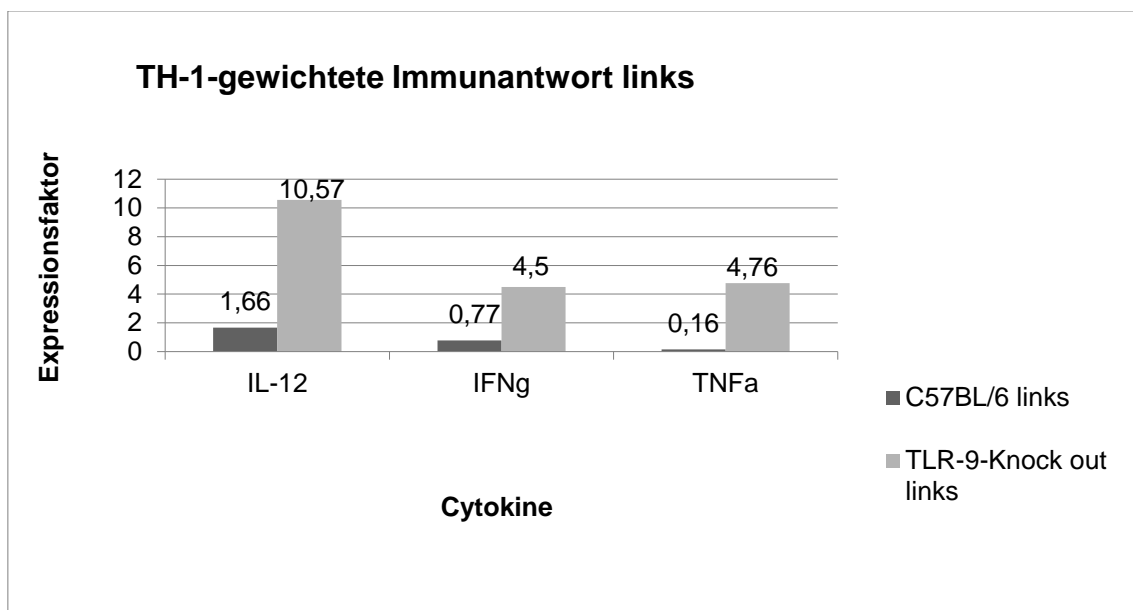
Tendenziell ist die Verteilung vergleichbar mit der des Gesamttumorgewebes. Bei genauer Betrachtung fällt allerdings auf, dass die Expressionsfaktoren des rechten Tumorgewebes bei den TLR-9-Knock-out-Tieren insgesamt deutlich höher sind: So werden Zytokine der TH-1-getriggerten Immunantwort in dieser Gruppe 13,12-fach, die Zytokine der TH-2-Antwort mit einem Faktor von 7,56

mehrexprimiert (im Gesamttumorgewebe betrug der Faktor der TH-1-Zytokine 8,59, der der TH-2-getriggerten 5,32).

4.2.5. Ergebnisse der Tumoren links

TH-1-gewichtete Immunantwort links

Mit ähnlichen Tendenzen stellt sich die Abbildung der TH-1-gewichteten Immunantwort mit deren Zytokinexpression im Gewebe der linken Tumoren dar: Den größten Unterschied der Expressionsfaktoren zeigt das Zytokin IL-12. Hier finden sich in beiden Gruppen Mehrfachexpressionen (C57BL/6 mit einem Faktor von 1,66, Knock-out-Mäuse mit einem Faktor von 10,57). IFN- γ und TNF- α werden in den behandelten Gruppen der C57BL/6 minder- (IFN- γ = 0,77; TNF- α = 0,16) und bei den Tieren der Knock-out-Gruppe mehrfach-exprimiert (IFN- γ = 4,5; TNF- α = 4,76).

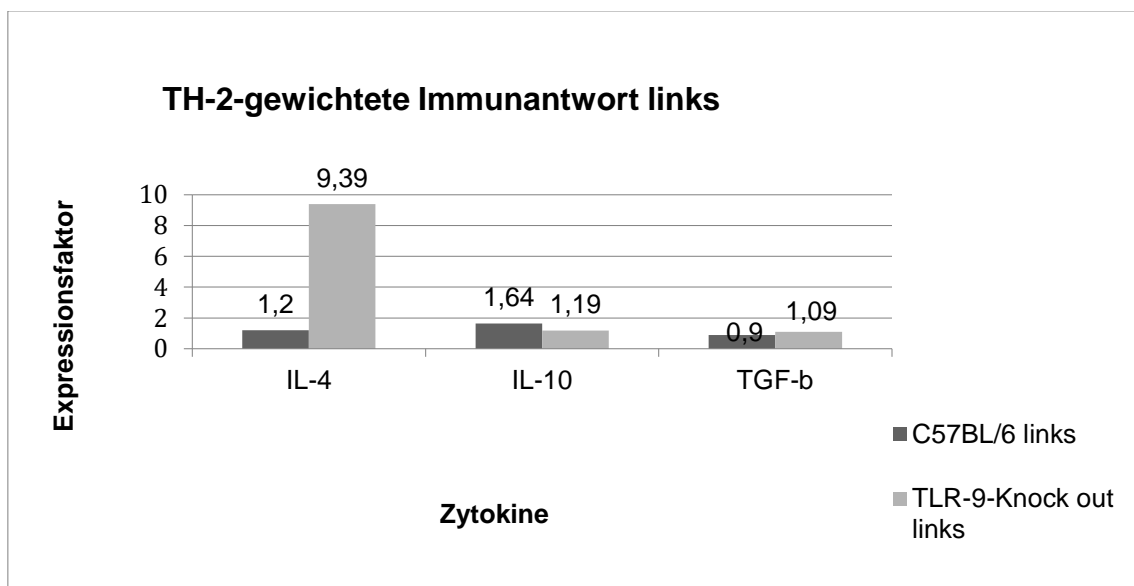


Diag.: Zytokinexpression der TH-1-gewichteten Immunantwort des linken Tumormaterials

TH-2-gewichtete Immunantwort links

Auch die TH-2-gewichtete Immunantwort des linken Tumormaterials präsentiert sich ähnlich wie die Schaubilder der Gesamtumoranzahl und des rechten Tumorgewebes:

IL-4 zeigt eine im Gegensatz zur rechten Seite geringe Mehrfachexprimierung mit dem Faktors 1,2 bei den C57BL/6-Mäusen und eine deutliche Mehrexprimierung von 9,39 bei den Tieren der Knock-out-Gruppe. Bei IL-10 lässt sich bei beiden Tierspezies erneut eine Mehrfachexprimierung nachweisen, in der die C57BL/6-Gruppe mit dem Faktor 1,64 die Mäuse der Knock-out-Gruppe mit dem Faktor 1,19 diskret überragen. Bei TGF- β zeigt sich eine Minderexprimierung bei den C57BL/6-Tieren (0,9) und eine nur unwesentliche Mehrfachexpression auf Seiten der Knock-out-Mäuse mit dem Faktor 1,09.



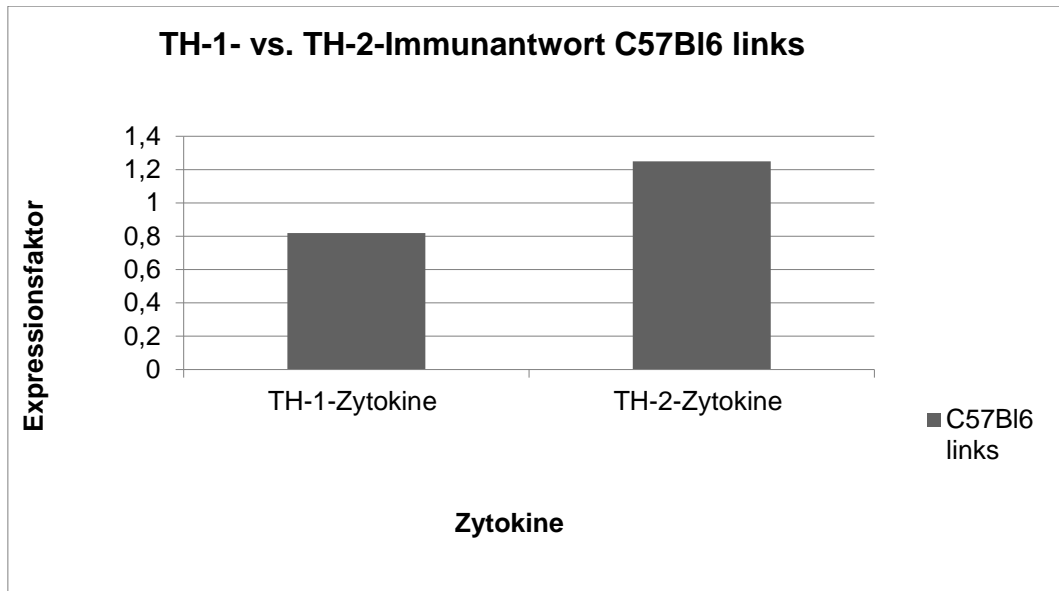
Diag.: Zytokinexpression der TH-2-gewichteten Immunantwort des linken Tumormaterials

TH-1- versus TH-2-gewichtete Immunantwort des linken Tumorgewebes

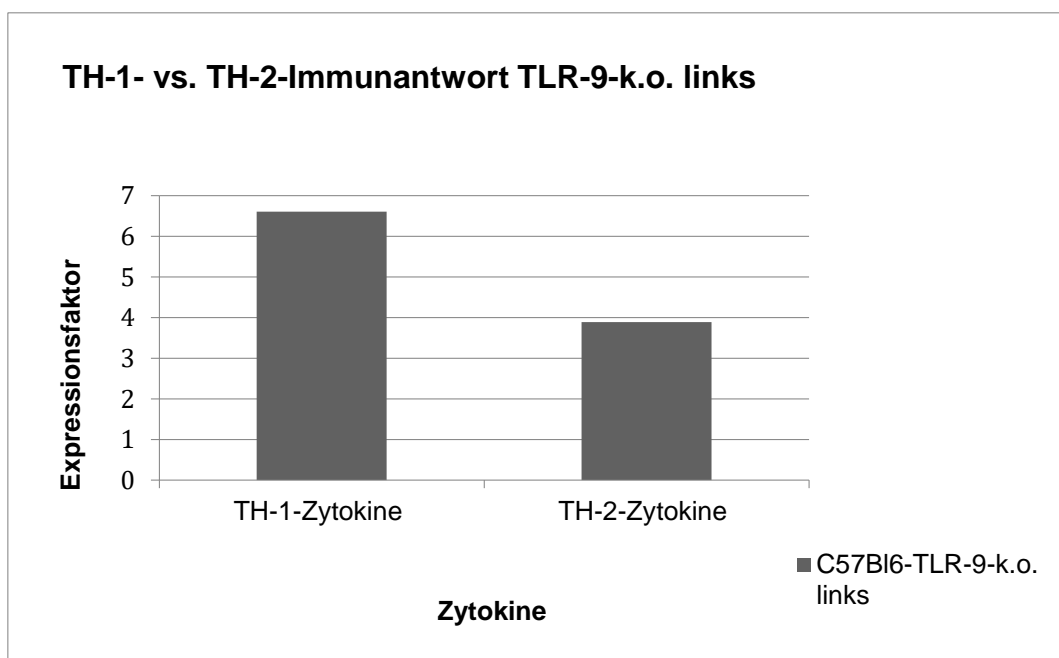
Die Darstellung der Expressionsfaktoren des linken Tumorgewebes präsentiert sich wie folgt:

Ergebnisse

Zytokine	C57BL/6-TLR-9-k.o. rechts	C57BL/6-TLR-9-k.o. links
TH-1-Zytokine	13.12	6.61
TH-2-Zytokine	7.56	3.89



Diag.: Vergleichende Darstellung der TH1- vs. TH2-Immunantwort des linken Tumorgebes der C57BL/6-Mausspezies



Diag.: Vergleichende Darstellung der TH1- vs. TH2-Immunantwort des linken Tumorgebes der C57BL/6-TLR-9-knock-out Mausspezies

Ergebnisse

Auch hier zeigt sich bei den C57BL/6-Mäusen eine vermehrte Stimulation der Genexpression der TH-2-getriggerten Zytokine und bei den TLR-9-Knock-out-Mäusen gegenteilig eine der TH-1-Zytokine IL-12, TNF- α und IFN- γ .

4.2.6 Vergleich der lokalen und systemischen Wirkung der CpG-Oligonukleotide

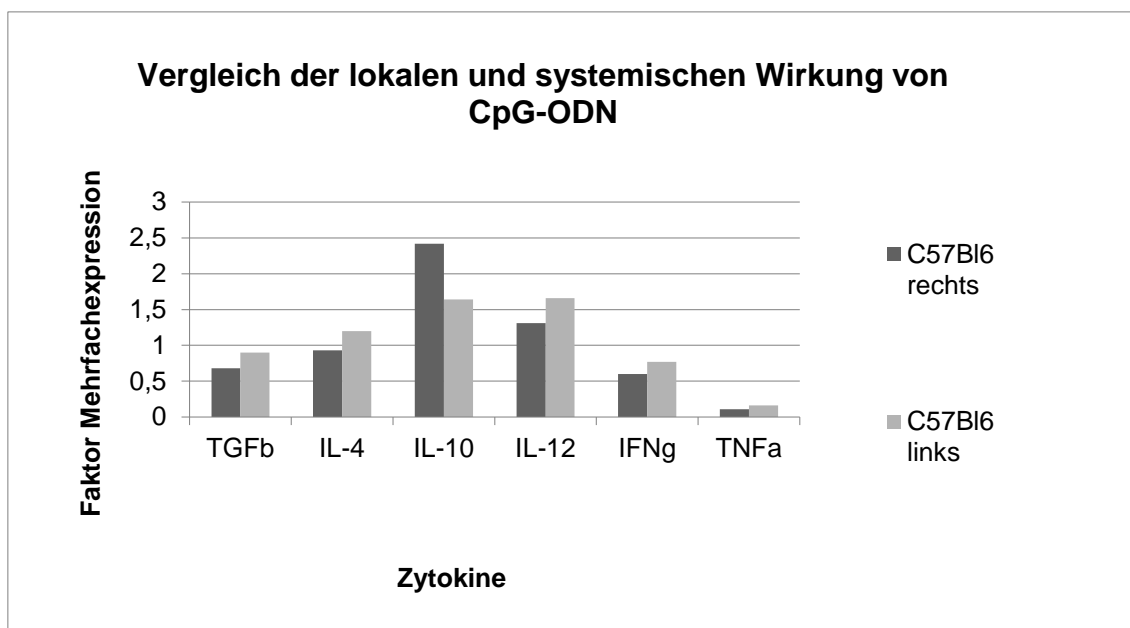
Nachdem die Ergebnisse seitenspezifisch dargestellt wurden, soll nun der Expressionsvergleich der Tumorgewebe rechts und links erfolgen. Ziel ist es, eine Aussage über die Unterschiede der lokalen und systemischen Wirkung der Oligonukleotide, die in unserer Versuchreihe nur rechtsseitig instilliert wurden, treffen zu können.

C57BL/6-Mausspezies

IL-10 zeigt auf Seiten der CpG-„therapierten“ rechtsseitigen Tumoren eine vermehrte Expression, was auf eine TH-2-gewichtete Immunantwort schließen lässt. Außerdem findet sich ebenfalls eine geringe Mehrfachexpression für IL-12. Alle übrigen Zytokine werden vergleichend zur Kontrollgruppe minderexprimiert.

Faktor der Genexpression	TGF- β	IL-4	IL-10	IL-12	IFN- γ	TNF- α
C57BL/6 rechts	0.68	0.93	2.42	1.31	0.6	0.11
C57BL/6 links	0.9	1.2	1.64	1.66	0.77	0.16

Ergebnisse



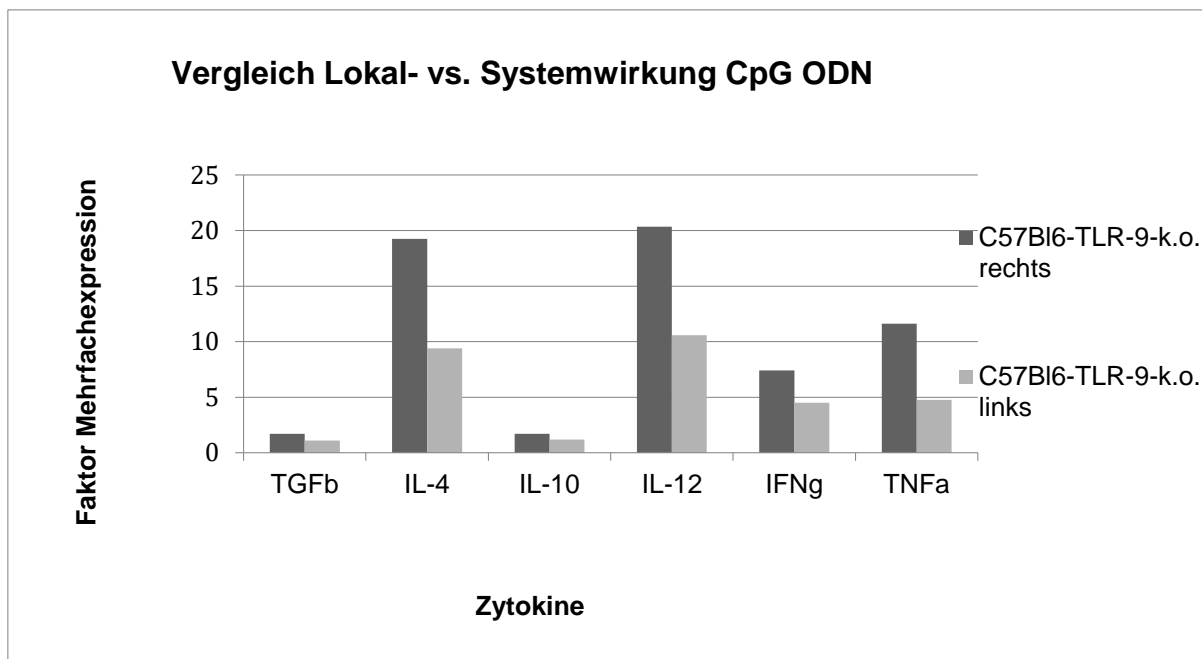
Diag.: Vergleich der Wirkung (lokalen versus systemischen) von CpG-ODN am Beispiel der C57BL/6-Mausspezies

C57BL/6-TLR-9(-/-)Knock-out-Mausspezies

Bei den Knock-out-Mäusen zeigt sich im Seitenvergleich rechtsseitig eine nahezu stets doppelte Mehrfachexpression aller untersuchten Zytokine. Maximale Faktoren von 20,34 und 19,26 finden sich sowohl auf Seiten der TH-1- als auch der TH-2-gewichteten Immunantwort.

Faktor der Genexpression						
	TGF- β	IL-4	IL-10	IL-12	IFN- γ	TNF- α
C57BL/6-TLR-9-K.o. rechts	1.71	19.26	1.7	20.34	7.41	11.62
C57BL/6-TLR-9-K.o. links	1.09	9.39	1.19	10.57	4.5	4.76

Ergebnisse



Diag.: Vergleich der Wirkung (lokalen versus systemischen) von CpG-ODN am Beispiel der C57BL/6-TLR-9-Knock-out Mausspezies

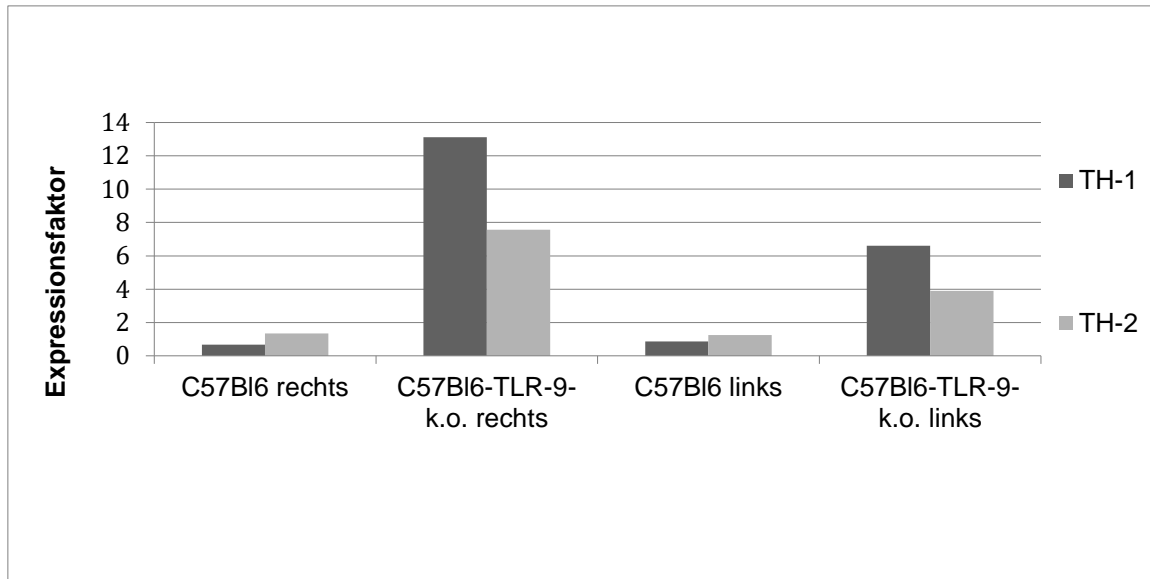
TH-1 vs. TH-2-gewichtete Immunantwort

Um die TH-1- mit der TH-2-Immunantwort vergleichen zu können erfolgt zunächst die Aufstellung isoliert:

TH-1-Immunantwort	Expressionsfaktor	
	rechts	links
C57BL/6	0.67	0.86
C57BL/6-TLR-9-K.o.	13.12	6.61

TH-2	Expressionsfaktor	
	rechts	links
C57BL/6	1.34	1.25
C57BL/6-TLR-9-K.o.	7.56	3.89

Ergebnisse



Diag.: Vergleichende Darstellung der Immunantwort (TH1 versus TH2) seitengesondert beider Mausspezies

Imponierend zeigt sich die ausgeprägte Mehrfachexpression sowohl der TH-1- als auch TH-2-Zielgene die Knock-Out-Mausspezies betreffend, wobei in Summe eine deutlich vermehrte TH-1-gewichtete Immunantwort vorliegt. Bei den C57BL/6-Mäusen zeigt sich lediglich eine geringe Mehrfachexpression der TH-2-Immunantwort.

5 Diskussion

Als häufigster Tumor des Harntraktes stellt das Harnblasenkarzinom 3 % aller malignen Krebserkrankungen dar (American Cancer Society, 2004). Trotz einer Vielzahl von Behandlungsmethoden und prognostisch günstigen Heilverfahren liegt die Rezidivwahrscheinlichkeit, abhängig von Tumorstadium und -grad, im ersten Jahr bei 70% (van der Meijden et al., 2007).

Die Therapie des Harnblasenkarzinoms erfolgt in Abhängigkeit von der individuellen pathologischen Klassifizierung des Tumors hinsichtlich des Stadiums und des morphologischen Differenzierungsgrades. So hat sich bei den oberflächlichen Harnblasentumoren die Instillation immunstimulativer Substanzen und Chemotherapeutika etablieren können. Diese führt nachweislich zu einer Senkung des hohen Rezidivrisikos und verzögert die Tumorprogression, wird allerdings von vielen Patienten aufgrund der hohen Nebenwirkungen abgebrochen (Witjes, 2008; Böhle, 2004; Lamm, 2000).

Ursprung dieser Behandlungsmöglichkeit liegt im 19. Jahrhundert, als der Chirurg William Coley 1894 die antitumoröse Wirkung des Tuberkulose-Impfstoffes BCG entdeckte (Kienle, 2003). Erst 1984 fanden Tokunaga und Mitarbeiter heraus, dass es nur explizite Anteile der BCG-DNA sind, die die immunstimulative antineoplastische Wirkung übermitteln (Tokunaga, 1984).

Untersuchungen zum BCG Wirkmechanismus haben bisher zeigen können, dass es im Zielgewebe zu einer Einwanderung von Granulozyten und mononukleären Zellen und damit einer unspezifischen inflammatorischen Reaktion kommt. Vor allem die Zytokine der Interleukinfamilie sowie IFN- γ waren hier, im Sinne einer TH-1-gewichteten Immunantwort, vermehrt zu finden (Böhle, 1990 und 2006; DeBoer, 2003; Esuvaranathan, 1995; Prescott, 1990; Ratliff, 1986 und 1987). Auch die TH-2-Zytokine IL-5 und IL-10 konnten nachgewiesen werden, wohingegen IL-4, als typischer Repräsentant der TH-2-Immunantwort, im Blasengewebe vermindert exprimiert wurde. (Böhle et al., 2003; McAveny et al., 1994). Desweiteren wurden zytotoxische Eigenschaften des BCG und auch der

durch BCG-aktivierten Makrophagen festgestellt (Böhle, 2000; Thanhäuser, 1993).

Trigger dieser immunologischen Reaktion scheint die bakterielle DNA zu sein, die – anders als beim Menschen – eine hohe Rate unmethylierter CG-Motive aufweist. Nach Erkennen dieser Sequenzen über den PRR TLR-9-Rezeptor erfolgt die Aktivierung des angeborenen und erworbenen Immunsystems (Tokunaga, 1984; Yamamoto, 1992; Razin, 1981; Krieg, 2002).

Aufgrund dieser Studien stellte man synthetisch DNA-Sequenzen mit zentralen CG-Motiven her (CpG-ODN), um *in vitro* und *in vivo* beobachtete Ergebnisse zu reproduzieren. Dabei zeigten sich folgende Ergebnisse: Die immunstimulative Wirkung wurde, ähnlich der BCG-induzierten, über eine TH-1-gewichtete Antwort des Immunsystems beobachtet. Nachweisbar kommt es zu einer Aktivierung dendritischer Zellen, sowie B-Zellen (Krieg, 1995 und 2000) und einer gesteigerten Zytokinproduktion immunkompetenter Zellen (Yamamoto, 1992 und 1998). Der so gestellte Beweis der immunstimulativen Wirkung der Deoxyoligonukleotide hatte weitere Forschungen zur Therapie auch in anderen Fachbereichen wie beispielsweise der Infektiologie und der Allergologie zur Folge (Davis, 2000; Hartmann, 2000; Dalpke, 2001 und 2002).

Untersuchungen der stimulativen Wirkung von CpG-ODN unserer Arbeitsgruppe am naiven murinen Urothel der Harnblase konnten ebenfalls Mechanismen - ähnlich der BCG-Wirkung - nachweisen:

Man beobachtete eine submuköse Lymphozyteninfiltration, die sich im Therapieverlauf auch in tieferen Schichten präsentierte und mit Follikelbildung durch mononukleäre Zellen sowie Apoptose urothelialer Zellen fortschritt.

Die Arbeitsgruppe um Hemmi bewies, dass die Induktion dieser Schritte sowohl beim Menschen als auch bei der Maus über den TLR-9-Rezeptor erfolgt. Dieser trägt die Schlüsselfunktion zum Erkennen bakterieller DNA und damit dem Auslösen einer Immunantwort (Hemmi, 2000). Er ist beim Menschen im Endosom

von B-Zellen und PDC (plasmazytoiden dendritischen Zellen) - bei der Maus auf nahezu allen Zellen - exprimiert und bewirkt nach Bindung des Liganden über eine Signalkaskade eine TH-1-gewichtete Immunantwort (Kadowaki, 2001; Bernasconi, 2003; Iwasaki, 2004). Durch seine Lokalisation dient er als Sensor bei intrazellulären Infektionen (Ishii, 2006).

Ziel der in dieser Arbeit vorgenommenen Untersuchungen ist, die Genregulation des Tumorgewebes nach CpG-Behandlung bei TLR-9-Knock-out-Mäusen zu untersuchen. Als Kontrolle fungierten Tiere der Mausspezies C57BL/6, denen, wie auch den TLR-9(-/-)Knock-out-Mäusen, an den Flanken subkutan Harnblasenkarzinomzellen appliziert wurden.

Die klinischen Ergebnisse dieser Arbeit beweisen ein klinisch besseres Outcome der mit CpG-ODN therapierten Gruppe.

So ist bei den C57BL/6-Tieren der Behandlungsgruppe eine durchschnittlich geringere Tumorgroße nachgewiesen worden, wohingegen die Tumore der TLR-9-Knock-out-Mäuse deutlich größer sind.

Hemmi et al. wiesen bei Versuchsreihen mit TLR-9(-/-)Knock-out-Mäusen nach Behandlung mit CpG-DNA keine Hochregulation der immunwirksamen Zytokine nach (Hemmi, 2000). Bei den von uns untersuchten Geweben zeigte sich entgegen der Erwartungen vor allem bei der Mausspezies der TLR-9-Knock-out-Tiere eine Steigerung der Genexpression der Zytokine sowohl der TH-1- als auch der TH-2-gewichteten Immunantwort. Ausgeprägter waren die Zytokine der TH-1-Antwort (IL-12, IFN- γ und TNF- α) exprimiert.

Eine gesteigerte Expression der TH-1-Zytokine erwartete man bei den C57BL/6-Mäusen. Hier zeigte sich hingegen eine diskrete Mehrexprimierung auf Seiten der TH-2-Antwort-repräsentierenden Zytokine IL-10, IL-4 und TGF- β . Den für die TH-1-Antwort verantwortlichen Zytokinen konnte sogar eine im Vergleich zur Kontrollgruppe verminderte Expression nachgewiesen werden.

Für die unerwarteten Ergebnisse lassen sich unterschiedliche Gründe postulieren, die im Folgenden anhand ähnlicher Studien erläutert werden und in Bezug auf die Wahl des Tiermodells und der Versuchsplanung als auch tumorzellbiologisch diskutiert werden sollen.

Zum Vergleich unseres Modells dienen Studien, die unter Verwendung der gleichen Knock-out-Mausspezies (TLR-9(-/-)), ein orthotopes Modell gewählt haben oder Forschungsgruppen, die das subkutane Modell ausschließlich bei C57BL/6-Tieren durchführten. Bisher gibt es keine Daten von subkutan induzierten MB-49-Tumoren an TLR-9-Knock-out-Mäusen. Auch der Zeitpunkt der CpG-ODN-Instillation, der bei uns zeitgleich mit der Tumorzellinstillation erfolgte, ist in erwähnten Studien zu einem späteren Zeitpunkt und wiederholt durchgeführt worden.

Deshalb kann ein Vergleich zunächst lediglich gruppengetrennt erfolgen:

C57BL/6-Tiere

Das subkutane Mausmodell - ähnlich dem unseren - wurde bereits von einer schwedischen Arbeitsgruppe durchgeführt, die die Wirkung von BCG und CpG bei orthotopen und subkutan induzierten MB49-Zelltumoren bei C57BL/6-Tieren verglichen. Auch hier zeigte sich ein deutlich besseres Outcome vor allem in Bezug auf die Tumorgroße bei den CpG-ODN-behandelten Mäusen. Nach Injektion von $2,5 \times 10^5$ MB49-Zellen erhielten diese eine therapeutische Instillation von je 100µg CpG an Tag 7, 10 und 13. Bei 3 von 5 Mäusen konnte hier eine komplette Tumorregression bis zum Tag 17 - dem Ende der Versuchsreihe - festgestellt werden. Selbst nach Reinjektion von MB49-Zellen wurde kein erneutes Tumorwachstum beobachtet. Sie wiesen eine hohe Konzentration von IL-12 im Serum der Mäuse auf (Mangsbo et al., 2008).

Auch in unserer Gruppe der einmalig mit CpG-ODN behandelten C57BL/6-Tiere zeigt sich nach einem Versuchszeitraum von lediglich 13 Tagen eine Reduktion der Tumorgroße (häufig nur Tumornarben zu finden) sowie eine im Tumorgewebe von allen untersuchten Zytokinen höchste Expression von IL-12

und damit einer TH-1-gewichteten Immunantwort, was die zuvor belegten Thesen bestätigt.

TLR-9-Knock-out-C57BL/6-Tiere

Hemmi et al. postulierte im Jahr 2000, dass die inflammatorische Antwort auf CpG-DNA über TLR-9 übermittelt sei, da sich bei TLR-9-Knock-out-Mäusen weder eine Zytokinproduktion noch die auf CpG-DNA folgende inflammatorische TH-1-Immunantwort nachweisen ließ. Dies wurde anhand weiterer Studien im Verlauf bestätigt (Hemmi, 2000; Iwasaki, 2004).

In unserer Versuchsreihe konnte bei den TLR-9-Knock-out-Mäusen allerdings eine deutlich erhöhte Zytokinexpression festgestellt werden, die den Rückschluß auf andere aktivierende Mechanismen des Immunsystems zulassen. So finden sich hier auch insbesondere im Tumorgewebe der mit CPG-ODN behandelten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe eine deutlich erhöht nachweisliche Expression aller Zielgene - ohne die Zuordnung einer TH-1- oder TH-2-gewichteten Immunantwort. Babiuk et al. wiesen in Ihrer Arbeit, in der TLR-9-Knock-out Mäuse vergleichend mit C57BL/6-Mäusen eine intradermale Immunisation unter anderem mit CpG-DNA erhielten, eine nahezu identische Immunantwort nach. Hiermit konnte gezeigt werden, dass die Immunantwort über multiple Mechanismen induziert wird und die TLR-9-induzierte Antwort nicht als alleinig essenziell angesehen werden kann (Babiuk, 2004).

Neben alternativen Wegen der Signalübermittlung kann als Grund für die abweichenden Ergebnisse auch die Versuchsplanung des Tiermodells angesehen werden. So sind in Studien mit gleicher Zellpopulation und CpG-ODN-Therapie die Untersuchungszeiträume bis zur Opferung der Tiere deutlich länger (Monate), so dass unser Versuchszeitraum als vergleichsweise kurz angesehen werden kann und somit Auswirkungen auf die nachgewiesene Immunreaktion haben kann (Kunze, 2008).

Unser Interesse galt weiterhin der Frage, ob neben der lokalen Wirkung der CpG-Oligonukleotide, die auf der rechten Seite instilliert wurden, auch eine

systemische Wirkung nachweislich ist. Dies wurde bereits durch unsere Arbeitsgruppe zuvor bestätigt (Hegele, 2004). Auffallend ist bei der Gruppe der TLR-9(-/-)Knock-out-Mäuse besonders die rechtsseitig eindeutig erhöhte Expression vergleichend zur Gegenseite, weshalb die lokale Wirkung als stärker ausgeprägt eingestuft werden kann. Die Arbeitsgruppe um Mastini zeigte, dass nach Gabe von CpG in nur eine der betroffenen tumorbefallenen Brustdrüsen klinisch die Tumorprogression im gesamten Brustdrüsengewebe verhindert wurde. Im Tumorgewebe der behandelten Brustdrüse konnte eine ausgeprägte lokale Infiltration von Makrophagen, Plasmazellen, B- und CD-4(+) und CD-8(+) T-Zellen nachgewiesen werden. Die benachbarten Brustdrüsen wurden nicht auf Zytokine oder immunkompetente Zellen untersucht, weshalb kein direkter Vergleich mit unserer Arbeit erfolgen kann. IFN- γ konnte erhöht nur im direkten Lymphabflußbereich nachgewiesen werden, natürliche Killerzellen in der Milz (Mastini, 2008).

Auch wir haben die Milz der Mäuse entnommen, deren zukünftige Materialverarbeitung noch weitere Aufschlüsse geben kann.

Aufgrund der unerwarteten Zytokinexpression ist zur Interpretation der Ergebnisse eine detaillierte Darstellung der einzelnen Zytokine und Ihrer Wirkung notwendig:

Bei der antitumorösen Immunantwort spielen vor allem die TH-1-assoziierten proinflammatorischen Zytokine IFN- γ , das in erster Linie von lymphatischen Zellen gebildet wird, sowie IL-12 und TNF- α , die vor allem Produkte der Makrophagen sind, eine wichtige Rolle. Sie üben einen positiven Effekt auf die Differenzierung, Proliferation oder Aktivierung der zellulären Effektoren aus.

IL-10 und TGF- β hingegen sind Vertreter der sogenannten antiinflammatorischen Zytokine, die den Effekten der oben genannten Zytokine entgegensteuern und deren physiologische Rolle in der Limitierung einer entzündlichen Reaktion besteht. Sie werden von einigen Tumorzellen gebildet, um die Aktivierung und Proliferation zytotoxischer Zellen zu unterbinden (Abbas et al., 2000; Tizzard, 2000; Roitt et al., 2000).

Mit dieser Erkenntnis ist es auch möglich, die Erhöhung der Genexpression von IL-10 bei den C57BL/6-Tieren zu erklären, das vermutlich von den in die Flanken instillierten Tumorzellen gebildet werden kann und damit die TH-1-gewichtete Antwort übertrifft. Dennoch zeigt sich am ehesten induziert durch die Behandlung mit CpG-ODN der Versuch einer TH-1-gewichteten Immunantwort durch nachgewiesene Mehrfachexpression auch von IL-12.

IFN- γ gilt als wichtigstes aktivierendes Zytokin von Makrophagen, zytotoxischen T-Zellen und natürlichen Killerzellen. Es scheint nicht nur die zytolytische Aktivität von Effektorzellen zu unterstützen, sondern auch deren Migration ins Tumorgewebe zu beeinflussen (Nakajima et al., 2001). Weiterhin verstärkt es die Expression von MHC-I- und -II-Molekülen auf APCs, dämmt bestehende Infektionen ein bevor T-Zellen zur Zytokinproduktion angeregt werden und hemmt die Proliferation von TH-2-Zellen. In Makrophagen bewirkt es die Produktion großer Mengen NO, einer Substanz, die eine inhibitorische Wirkung auf das Wachstum von Tumorzelllinien gezeigt hat (Fujiwara et al., 1997). Es gibt Hinweise dafür, dass IFN- γ zudem eine protektive Wirkung gegen Tumoren ausübt, indem es eine Inhibition der zellulären Proliferation und der Angiogenese hervorruft. Die Bedeutung von IFN- γ im Rahmen der Tumormunität wurde dadurch bekannt, dass die Abstoßung von transplantierten chemisch induzierten Fibrosarkomen in Mäusen durch neutralisierende Antikörper gegen IFN- γ aufgehalten wurde (Ikeda et al., 2002). Außerdem zeigten IFN- γ -defiziente Mäuse in Tierversuchen häufiger Tumoren, was ebenfalls dafür spricht, dass dieses Zytokin eine Rolle beim Schutz vor spontan entstehenden Tumoren spielt (Smyth et al., 2001).

In der Behandlungsgruppe der Versuchsreihe mit C57BL/6-Mäuse wurde es im Gegensatz zur Kontrollgruppe vermindert exprimiert - anders bei den TLR-9-Knock-out-Mäusen, in deren Genom eine deutliche Mehrfachexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe festzustellen war.

TNF- α stimuliert lokale Entzündungsreaktionen, die zur Infektionseindämmung beitragen und ist ein starker Aktivator der Endothelzellen. Es ermöglicht durch

eine erhöhte Permeabilität den Einstrom von Komplement und Antikörpern. Zudem steigert es durch ebengenannten Mechanismus die Flüssigkeitsableitung zu den Lymphknoten. Als systemische Komponente triggert sein Auftreten Fieber und Schock. Weiterhin begünstigt TNF- α die Wanderung von antigenpräsentierenden Zellen zu den Lymphknoten, wo sie CD-4-Zellen antreffen. Die Freisetzung von TNF- α wird über den TLR-4-Rezeptor reguliert. Zudem ist es ein wichtiges Effektormolekül für die T-Zell- und NK-Zell-vermittelte Lyse von immunogenen Tumorzellen. Es fördert die Proliferation und IFN- γ -Produktion in T-Lymphozyten und NK-Zellen (Le und Vilcek, 1987). Neben seiner Bedeutung für die Aktivierung zytotoxischer Zellen besitzt es eine direkte antitumorale Wirkung, indem es durch Rezeptorbindung die Apoptose von Tumorzellen auslösen kann oder in hohen lokalen Konzentrationen durch Induktion von Gefäßthrombosen die Nekrose des Tumorgewebes hervorruft (Abbas et al., 2000). Andererseits scheint chronisch-niedrigdosiertes TNF- α auch als Tumorpromotor zu wirken, da es die DNA-Mutagenese durch reaktive Stickstoffverbindungen und die Ausbildung eines Tumorstromas begünstigt (Balkwill, 2002).

Im Tumormaterial der C57BL/6-Tiere fand sich TNF- α minderexprimiert, wohingegen in dem der Knock-out-Mäuse nach Behandlung eine massive Expression gemessen wurde. Hierfür könnte beim Fehlen des TLR-9-Rezeptors eine Hochregulation des TLR-4-Rezeptors ursächlich sein, der die Freisetzung dieses Zytokins reguliert.

IL-12 nutzt die Mechanismen der erworbenen und der angeborenen Immunität, um seine Wirkung gegen Tumoren auszuüben (Bingle et al., 2002). Es fördert die Proliferation und zytotoxische Aktivität von NK-Zellen und zytotoxischen T-Lymphozyten und induziert die Zytokinsekretion, insbesondere von IFN- γ . Ein weiterer Effekt dieses Zytokins ist die Entwicklung naiver CD-4(+) T-Zellen zu TH-1-Zellen (Brunda, 1994; Trinchieri, 2003). Über IFN- γ führt es indirekt zur Aktivierung von Makrophagen (Brunda et al., 1996). In verschiedenen Studien wurde ein starker antitumoraler und antimetastatischer Effekt von IL-12 nachgewiesen, der durch die Proliferation und Aktivierung von NK- und T-Zellen

und die daraus resultierende Zytokinsekretion, vor allem von IFN- γ , vermittelt wird (Fujiwara, 1996; Yu et al., 1997; Colombo und Trinchieri, 2002). Obwohl IL-12 in Tierversuchen einen deutlichen therapeutischen Effekt gegen verschiedene murine Tumoren zeigt, konnte es jedoch bislang wegen seiner starken Toxizität klinisch nicht eingesetzt werden (Smyth et al., 2000).

In unseren Versuchen fand sich (als einziges der TH-1-repräsentierenden Zytokine) eine Mehrfachexpression in der Behandlungsgruppe der C57BL/6-Tiere. Auch bei den Tieren der Knock-out-Mäuse konnte eine eindeutige Mehrfachexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden.

TNF- α und IL-12 sind als erste Zytokine bei einer Immunreaktion nachzuweisen. Ihr Maximum findet sich bereits am 2. Tag post infectionem; ab dem 3./4. Tag erfolgt das Töten infizierter Zellen durch die natürlichen Killerzellen und erst ab dem 7./8. Tag kommt es zum T-Zell-vermittelten Töten infizierter Zellen. Demnach ist es möglich, dass bei den Tieren der C57BL/6-Mäuse bereits am 13. Tag der Versuchsreihe, an dem die Tiere getötet wurden, die TH-2-Antwort überhand nahm und mittels ihrer Zytokine die TH-1-Antwort hemmte.

Im Bereich der TH-2-vermittelten Immunantwort zählt IL-4 zu den wichtigsten Vertretern. Es wird ausschließlich an der Kontaktstelle der Zielzelle sezerniert und wirkt selektiv auf antigenspezifische B-Zellen. Es antagonisiert zusammen mit IL-6 und IL-10 die IFN- γ -vermittelte Makrophagenaktivierung. Weiterhin begünstigt IL-4 die Proliferation der B-Zellen und induziert die Expression von MHC-II-Molekülen auf deren Oberfläche. Große Mengen an IL-4 führen zu einer Hemmung der TH-1-gewichteten Immunantwort (Janeway et al., 2002).

IL-10 ist hingegen ein wichtiger Regulator der zellulären Immunantwort mit antiinflammatorischer Wirkung. Von T-Zellen, Monozyten und B-Zellen gebildet, inhibiert es die Aktivierung, Proliferation und Zytokinsynthese von Lymphozyten (Moore et al., 2001). Weiterhin hemmt IL-10 die Aktivierung von Makrophagen und die Produktion von IL-12 und TNF- α sowie die Expression von MHC II und kostimulatorischen Molekülen auf Antigen-präsentierenden Zellen. Es wird vermutet, dass die Fähigkeit von IL-10, die Zytokin-Synthese in T-Zellen und NK-

Zellen zu hemmen, auf diese Beeinträchtigung der Antigen-präsentierenden Zellen zurück zu führen ist (Fiorentino et al., 1991). In verschiedenen malignen Zelltypen konnte eine gesteigerte IL-10-Synthese nachgewiesen werden, weshalb man spekuliert, ob die Produktion dieses Zytokins eine Möglichkeit darstellt, der Immunantwort gegen Tumoren zu entweichen (Kim et al., 1995). Bei den C57BL/6-Mäusen findet sich IL-4 gemeinsam mit IL-10 erhöht, was ursächlich für die nachgewiesene Mindereexpression von IFN- γ sein kann und damit auch die Aussage der oben genannten These unterstützen würde.

Das antiinflammatorische Zytokin TGF- β unterdrückt das Wachstum von T- und B-Zellen. Es vermindert sowohl die TNF- α -Synthese als auch die Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen und die Adhäsion von Granulozyten an Endothelzellen. In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass TGF- β die Entstehung spezifischer zytotoxischer und inflammatorischer T-Zellen inhibiert und eine Verringerung der zellulären Infiltration mit herabgesetzter MHC-II-Expression und erniedrigter Anzahl von CD-8(+) T-Zellen im Gewebe Virus-infizierter Tiere hervorruft. In Hinblick auf die Bedeutung im Rahmen der Tumormunität konnte für Glioblastome und die akute T-Zell-Leukämie nachgewiesen werden, dass Tumorzellen durch die Bildung von TGF- β zu einer Immunsuppression führen (Fontana et al., 1992). Generell gilt für Tumore, dass die Expression dieses Gens herunterregliert ist, da es für die Inhibition unkontrollierten Zellwachstums verantwortlich ist (Gold, 1999) und daher insbesondere in Tumorzellgewebe minderexprimiert wird, wie es auch in unserer Versuchsreihe gezeigt werden konnte.

Die Tatsache, dass insbesondere in der Gruppe der TLR-9(-/-)Knock-out-Mäuse eine ausgeprägte TH-1- als auch TH-2-Immunantwort unter CpG-ODN-Therapie nachgewiesen werden konnte, legt die Vermutung nahe, dass Karzinomzellen selbst TLR-9-Rezeptoren ausbilden können. Dies konnte am Beispiel der chronisch lymphatischen Leukämie als auch des Burkitt-Lymphoms nachgewiesen werden (Decler et al., 2001; Henault et al., 2005). Bei der von uns angewendeten Urothelkarzinomzelllinie (MB49) wurde allerdings in unserer

Arbeitsgruppe eine Expression von TLR-9 widerlegt (Olbert et al., 2004). Zusätzlich konnten bei in vitro Versuchen mit CpG-ODN an der MB49-Zelllinie, weder ein proapoptotischer Effekt noch eine Wachstumshehmung oder Nekrose an den Zellen nachgewiesen werden, was gegen einen direkten Effekt von CpG-ODN auf die Tumorzellen spricht (Hegele et al., 2004).

Am ehesten lässt sich die ausgeprägte Zytokinantwort - trotz Fehlen des TLR-9-Rezeptors im Knock-out-Mausmodell - auf das Vorhandensein anderer immunmodulatorischer Pathways zurückführen. Dies postulierten bereits Wang et al., die die alleinige Anwesenheit von TLR-9 als nicht ausreichend ansahen, um die immunstimulatorische Wirkung von CpG-ODN zu vermitteln (Wang et al., 2005).

Nachweislich – insbesondere unterstützt auch durch unsere klinischen Ergebnisse mit deutlich reduzierter Tumormasse – besitzt CpG multiple antineoplastische Effekte, deren genaue Wirkmechanismen nicht geklärt sind. Inwieweit vergleichend zur Monotherapie außerdem eine therapeutische Wirkung in Kombination mit anderen Tumorthapien möglich ist, kann erst durch weitere Studien erklärt werden. Beispielhaft erwähnt werden soll hier die verbesserte Ansprechbarkeit auf Strahlen- oder Chemotherapie, wie es am Mammakarzinom im murinen Modell gezeigt werden konnte (Mason, 2006).

Die vielversprechenden Untersuchungen am murinen Mausmodell lassen sich allerdings nicht uneingeschränkt auf den Menschen übertragen. Seit einigen Jahren werden im Rahmen klinischer Studien geeignete CpG-ODN eingesetzt. Hierbei konnten bei diversen Tumorentitäten eine Aktivierung des Immunsystems festgestellt werden (Link, 1997; Friedberg, 2005). Die Anwendung wurde gut toleriert und zeigte bei einer kombinierten Anwendung - beispielsweise zur Standardchemotherapie - verbesserte Ansprechraten als auch eine verbesserte Überlebensrate (Leonard, 2007; Manegold, 2005). Erste Phase III-Studien wurde bereits im Jahr 2005 initiiert, um einen Einsatz in Kombination zu der herkömmlichen Chemo- oder Radiotherapie zu überprüfen (Murad, 2007).

Bereits bis zum Jahr 2014 erfolgten mehr als 100 klinische Studien (einschl. Phase III) mit Anwendung von CPG-ODN nicht nur in der Onkologie, sondern auch in der Allergologie und der Infektiologie.

Nach den vielversprechenden Tierversuchsreihen scheint der Erfolg der klinischen Studien mit CPG-ODN in der Onkologie alleinig allerdings insgesamt enttäuschend. Beispielsweise erreichte eine intracerebrale Applikation bei Auftreten eines Glioblastoms keine Verlängerung des Überlebens und Versuchsreihen ergänzend zur Chemotherapie beim nicht kleinzelligen Lungenkarzinom erbrachten keine positiven Effekte (Ursu et al., 2016; Shirota et al., 2014)

Verantwortlich hierfür sind möglicherweise auch die unterschiedlichen Expressionsmuster der TLR-9-Rezeptoren, die beim Menschen nur in B- und dendritischen Zellen zu finden sind, bei der Maus zusätzlich auch bei Monozyten und Makrophagen (Eckl-Dorna J et al., 2009).

Infektiologisch sind dagegen große Fortschritte und Erfolge zu verzeichnen. So konnte beispielsweise ein potenter Hepatitis B Impfstoff (HEPLISAV-B®) durch die FDA im Jahr 2017 zugelassen werden, der als Wirkverstärker CpG-Motive enthält und einen Schutz vor allen Hepatitis-B-Viren nach nur 2 Injektionen verspricht (Schillie S et al., 2018).

Was infektiologisch erreicht wird, bekräftigt die Hoffnung auf die weiteren klinischen Anwendungen und Optimierungen dieses Adjuvanz auch in der Onkologie, und lässt den Titel von Krieg aus dem Jahr 2012 „CpG still rocks“ auch heute noch brandaktuell sein.

6 Zusammenfassung

Das Harnblasenkarzinom hat als zweithäufigste maligne urologische Tumorerkrankung einen hohen Stellenwert. Seit Jahren zählt die intravesikale Instillation von BCG zur Standardtherapie insbesondere des Hoch-Risiko Urothelkarzinoms. Diese wird aufgrund des hohen Nebenwirkungsprofils häufig von Seiten der Patienten abgebrochen.

In der Erforschung des Wirkmechanismus von BCG konnten als verantwortliche immunmodulatorische Komponenten CG-reiche DNA-Sequenzen (CpG-ODN) gefunden werden. Im murinen Modell wurde die Stimulation bestimmter Zytokine und Mediatoren im Sinne einer TH-1-Immunantwort nach Bindung an den TLR-9-Rezeptor nachgewiesen.

In dieser Arbeit wurde am Beispiel des Harnblasenkarzinoms unter der Therapie mit CpG-ODN das Zytokinmilieu bei C57BL/6 und TLR-9(-/-)Knock-out-Mäusen im Tumormaterial vergleichend untersucht. Wir etablierten ein subkutanen Modell, in dem alle Tiere durch Injektion von je 1 Millionen Tumorzellen (MB49) im Bereich beider Flanken einen palpablen Tumor entwickelten. Insgesamt wurden 38 Tiere untersucht (20 Tiere der Spezies C57BL/6 und 18 TLR-9(-/-)C57BL/6-Mäuse). Jeweils die Hälfte der Tiere erhielt am Tag der Tumorzellinstillation CpG-ODN in das rechtsseitig instillierte Tumorzellinfiltrat. Nach Opferung der Tiere und Entnahme des subkutanen Tumormaterials wurde dieses mittels Real-Time-PCR bezüglich der Zytokin-Expression untersucht. Klinisch zeigte sich eine deutlich kleinere Tumorgroße der behandelten Tiere, wobei die Tumore der Knock-out-Mäuse im Vergleich zu den C57BL/6-Tieren insgesamt größer waren.

Die mit CpG-ODN behandelten C57BL/6-Mäuse wiesen eine vor allem TH-2-gewichtete Immunantwort auf, wobei auch IL-12 - als Hauptvertreter der TH-1-gewichteten Immunantwort - vermehrt exprimiert wurde. Als Ursache für diese Ergebnisse machen wir zum einen den sehr frühen Therapiebeginn mit CpG-

ODN als auch die relativ frühe Opferung der Tiere am 13. Tag der Versuchsdurchführung verantwortlich.

In der Behandlungsgruppe der TLR-9(-/-)Knock-out-Mäuse zeigte sich eine ausgeprägte Mehrfachexprimierung der Zytokine sowohl der TH-1- als auch der TH-2-Antwort. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass nicht allein die Signalkaskade über den TLR-9-Rezeptor, sondern auch andere immunstimulative Mechanismen wirken.

Vergleicht man die jeweiligen Tumore (rechts und links) der untersuchten Tiere, so ist von einer systemischen Wirkung von CpG-ODN auszugehen, da auch auf der nicht behandelten Seite immunmodulatorische Mechanismen mit Erhöhung spezifischer Zytokine nachweislich waren.

Der therapeutische Einsatz von CpG-ODN wird nicht nur im Bereich der Onkologie an Bedeutung gewinnen. Hierfür ist es wünschenswert, die Wirkmechanismen durch weitere Forschung noch genauer zu verstehen. Auf diese Weise kann es gelingen, dieses vielversprechende Behandlungsprinzip für weitere Indikationen zu etablieren und effektiv in der medizinischen Praxis einzusetzen.

Summary

Bladder cancer is the second most common malignant urological tumor disease. For years, the intravesical instillation of BCG has been a standard therapy, especially for high-risk urothelial carcinoma. Due to the high side effect profile, this therapy is often discontinued by patients.

Investigations into the mechanism of action of BCG have revealed CG-rich DNA sequences (CpG-ODN) as the responsible immunomodulatory components. In the murine model, the stimulation of certain cytokines and mediators in the sense of a TH-1 immune response after binding to the TLR-9 receptor was detected.

In this dissertation, the cytokine milieu in C57BL/6 and TLR-9(-/-)knock-out mice was compared in tumor material using the example of bladder carcinoma under therapy with CpG-ODN. We established a subcutaneous model in which all animals developed a palpable tumor by injecting 1 million tumor cells (MB49) each in the area of both flanks. A total of 38 animals were examined (20 animals of species C57BL/6 and 18 TLR-9(-/-)C57BL/6 mice). Half of the animals each received CpG-ODN into the right-sided infiltrated tumor cell on the day of tumor cell instillation. After sacrifice of the animals and removal of the subcutaneous tumor material, the cytokine expression was investigated by real-time PCR. Clinically, the treated animals showed a significantly smaller tumor size, with the tumors of the knock-out mice being larger overall compared to the C57BL/6 animals.

The C57BL/6 mice treated with CpG-ODN showed a mainly TH-2-weighted immune response, whereby IL-12 - as the main representative of the TH-1-weighted immune response - was also increasingly expressed. We attribute these results to the very early start of therapy with CpG-ODN as well as the relatively early sacrifice of the animals on the 13th day of the trial. In the treatment group of TLR-9(-/-)knock-out mice, a pronounced multiple expression of cytokines of both the TH-1 and TH-2 response was observed. These results suggest that not only the signalling cascade via the TLR-9 receptor,

but also other immunostimulatory mechanisms are at work. Comparing the respective tumours (right and left) of the animals examined, a systemic effect of CpG-ODN can be assumed, since immunomodulatory mechanisms with an increase in specific cytokines were also found on the non-treated side.

The therapeutic use of CpG-ODN will not only gain importance in the field of oncology. For this purpose, it is desirable to understand the mechanisms of action even more precisely through further research. In this way, it may be possible to establish this promising treatment principle for further indications and use it effectively in medical practice.

7 Literaturverzeichnis

- Ahmad-Nejad P, Häcker H, Rutz M, Bauer S, Vabulas RM, Wagner H.
Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments.
Eur J Immunol. 2002 Jul;32(7):1958-68.
- Akira S, Takeda K.
Toll-like receptor signalling.
Nat Rev Immunol 2004; 4:499-511
- Albers P, Heidenreich A (Hrsg).
Standardoperationen in der Urologie
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York; 2006
- Amling CL.
Diagnosis and management of superficial bladder cancer
Curr Probl Cancer 2001, 25:219-278
- Babiuk S., Mookherjee N, Pontarollo R., Griebel P., Van den Hurk S., Hecker R., Babiuk L.
TLR9^{-/-} and TLR9^{+/+} mice display similar immune responses to a DNA vaccine
Immunology. 2004 Sep; 113(1): 114–120.
- Baines J, Celis E.
Immune-mediated tumor regression induced by CpG-containing oligodeoxynucleotides.
Clin Cancer Res 2003; 9:2693-2700.

Babjuk M, Oosterlink W, Sylvester R, Kaasinen E, Böhle A, Palou J.

Guidelines on TaT1 (non-muscle invasive) bladder cancer.

EAU Guidelines 2008 edition,2008; p.: 2-20;

Bassi P, Ferrante GD, Piazza N, Spinadin R, Carando R, Pappagallo G,
Pagano F.

Prognostic factors of outcome after radical cystectomy for bladder cancer:
a retrospective study of a homogeneous patient cohort.

Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, Wagner
H, Lipford GB.

Human TLR 9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific
CpG motif recognition.

Proc Natl Acad Sci USA 2001b, 24: 24;

Bendigs S, Salzer U, Lipford GB, Wagner H, Heeg K.

CpG-oligodeoxynucleotides co-stimulate primary T cells in the absence of
antigen- presenting cells.

Eur.J.Immunol. 1999,1209-18.

Bernasconi NL., Onai N., Lanzavchia A.

A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9
by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory
B cells.

Blood 2003; 101:4500-4504

Bichler KH (Hrsg).

Interdisziplinäres Tumorzentrum der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Empfehlungen zu Diagnose, Therapie und Nachsorge 2001

Bird AP.

CpG-rich islands and the function of DNA methylation

Nature 1986, 209-213;

Biron CA, Cousens LP, Ruzek MC, Su HC, Salazar-Mather TP.

Early cytokine responses to viral infections and their roles in shaping
endogenous cellular immunity.

Adv Exp Med Biol. 1998;452:143-9.

Böcker W, Denk H, Heitz PU.

Pathologie

3.Auflage, Urban&FischerVerlag (2004), p.870-874

Bohle B, Jahn-Schmid B, Maurer D, Kraft D, Ebner C.

Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs induce IL-12, IL-18 and IFN-
gamma production in cells from allergic individuals and inhibit Ig-E sythesis
in vitro

Eur. J.Immunol. 1999:2344-53.

Böhle A, Gerdes J, Ulmer AJ, Hofstetter AG, Flad HD.

Effects of local bacillus Calmette-Guerin therapy in patients with bladder
carcinoma on immunocompetent cells of the bladder wall.

J Urol 1990, 144:53-58. ;

Böhle, A.

Das Harnblasenkarzinom. Diagnostik, organerhaltende Therapie,
Rezidivprohylaxe

Urologe 1997, B37:400-413;

Böhle A, Brandau S.

Immune mechanisms in bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for superficial bladder cancer.

J Urol. 2006 Sep;170(3):964-9. Review.

Böhle A, Jocham D, Bock PR.

Intavesical bacillus Calmette-Guerin versus mitomycin C for superficial bladder cancer: a formal meta-analysis of comparative studies on recurrence and toxicity.

J Urol 2003; 169(1): 90–95

Brandau S, Suttman H.

Thirty years of BCG immunotherapy for non-muscle invasive bladder cancer: a success story with room for improvement.

Biomed Pharmacother 2007; 61:299-305.

Cha, E:K., et al.,

Immunocytology is a strong predictor of bladder cancer presence in patients with painless hematuria: a multicentre study.

Eur Urol, 2012. 61 (1):p 1,85-92.

Coley, WB

The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893.

Clin Orthop 262: 3-11.1991

Dalbagni G.

The management of superficial bladder cancer.

Nat Clin Pract Urol. 2007 May;4(5):254-60

Dalpke A, Zimmermann S, Heeg K.

CpG-oligonucleotides in vaccination: signaling and mechanisms of action.

Immunobiology 2001; 204:667-676.

Dasari P, Nicholson IC, Hodge G, Dandie GW, Zola H.

Expression of toll-like receptors on B lymphocytes.

Cell Immunol 2005; 236:140-145.

De Boer EC, De Jong WH, Steerenberg PA, Aarden LA, Tetteroo E, De Groot ER, Van der Meijden AP, Vegt PD, Debruyne FM, Ruitenberg EJ.

Induction of urinary interleukin-1 (IL-1), IL-2, IL-6, and tumour necrosis factor during intravesical immunotherapy with bacillus Calmette-Guérin in superficial bladder cancer.

Cancer Immunol Immunother 1992; 34:306-312.

De Boer EC, Rooijackers SJ, Schamhart DH, Kurth KH.

Cytokine gene expression in a mouse model: the first instillations with viable bacillus Calmette-Guerin determine the succeeding Th1 response.

J Urol 2003, 170:2004-2008.

Decker T, Peschel C.

Effect of immunostimulatory CpG-oligonucleotides in chronic lymphocytic leukemia B cells.

Leuk Lymphoma 2001; 42:301-307.

Dittmer U, Olbrich RM A.

Treatment of infectious diseases with immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing CpG motifs

Cur Opin in Microbiology 2003, 6:472-477

Eckl-Dorna J, Batista FD.

BCR-mediated uptake of antigen linked to TLR9 ligand stimulates B-cell proliferation and antigen-specific plasma cell formation.

Blood 113(17), 3969–3977 (2009)

Flam T, Amsellem-Ouazana D, Ameur A, Husson E.

Mémento Urologie-2ième edition

Maloine, Paris, France, (2002) p.227-251;

Fossa SD, Berner A.

Clinical significance of the "palpable mass" in patients with muscle-infiltrating bladder cancer undergoing cystectomy after preoperative radiotherapy.

Br J Urol 1991;67:54-60

Friedberg JW, Kim H, McCauley M, Hessel EM, Sims P, Fisher DC, Nadler LM, Coffman RL, Freedman AS.

Combination immunotherapy with a CpG oligonucleotide (1018 ISS) and rituximab in patients with non-Hodgkin lymphoma: increased interferon-alpha/beta-inducible gene expression, without significant toxicity.

Blood 2005; 105:489-495.

Gakis G, Fahmy O

Systematic Review and Meta-Analysis on the Impact of Hexaminolevulinate- Versus White-Light Guided Transurethral Bladder Tumor Resection on Progression in Non-Muscle Invasive Bladder Cancer.

Bladder Cancer. 2016 Jul 27;2(3):293-300.

Ganten D, Ruckpaul K

Tumorerkrankungen, Handbuch der molekularen Medizin,
Springer Verlag Berlin Heidelberg 1998, S.43-78

Ganten D, Ruckpaul K. (Hrsg)

Molekularmedizinische Grundlagen von nicht-hereditären
Tumorerkrankungen

1. Auflage (2002), Springer Verlag, p.291-328

Garcia-Cuesta EM, Lopez-Cobo S, Alvarez-Maestro M, *et al.*

NKG2D is a key receptor for recognition of bladder cancer cells by IL-2-activated NK cells and BCG promotes NK cell activation.

Front Immunol 2015; 6: 284.

Gemsa D, Kalden JR, Resch K (Hrsg.).

Immunologie-Grundlagen, Klinik, Praxis

Auflage Thieme Verlage, 1997;

Gold LI

The role for transforming growth factor-beta (TGF-beta) in human cancer.

Critical reviews in Oncogenesis, [1999, 10(4):303-360]

Golka K, Goebell PJ, Rettenmeier AW

Ätiologie und Prävention des Harnblasenkarzinoms: Teil 1 der Serie zum Harnblasenkarzinom, Bladder Cancer: Etiology and Prevention,

Dtsch Arztebl 2007; 104(11): A-719 / B-633 / C-609

Graziano DF, Finn OF,

Tumor antigens and tumor antigen discovery,

Cancer Treat Res 2005, 123; 89-111

Günther JH, Jurczok A, Wulf T, Brandau S, Deinert I, Jocham D, Böhle A.

Optimizing synergistic orthotopic murine bladder cancer (MB 49)

Cancer Research, 1999; 2864-2837;

Günther JH, Jurczok A, Werner H, Jocham D, Böhle A.

Optimal treatment of systemic bacillus Calmette-Guérin infection-

Investigations in an animal model

J.Urol., 2002; 826-831;

Hartinger J, Häußermann R, Olbert P, Hofmann R, Hegele A

Predictors for presence of residual tumor in follow-up transurethral resection of bladder tumors: single center results

Urologe A. 2013 Apr. 52(4):557-61.doi:10.1007/s00120-012-3109-x.German.

Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV.

The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein.

Cell 1988, 52:269-279.

Hautmann S, Huland H (Hrsg.)

Urologie.

Springer Medizin Verlag Heidelberg 2006: 202-212;

Heckelsmiller K, Rall K, Beck S, Schlamp A, Seiderer J, Jahrsdörfer B, Krug A, Rothenfusser S, Endres S, Hartmann G.

Peritumoral CpG DNA elicits a coordinated response of CD8 T cells and innate effectors to cure established tumors in a murine colon carcinoma model.

J Immunol 2002; 169:3892-3899.

Hegele A, Heidenreich A, Varga Z, von Knobloch R, Olbert P, Kropf J, Hofmann R.

Cellular fibronectin in patients with transitional cell carcinoma of the bladder.

Urol Res 2003, 30:363-366;

Hegele A¹, Dalpke A, Barth P, Varga Z, Heeg K, Hofmann R, Olbert P.

Antineoplastic effect of immunostimulatory DNA (CpG-ODN) in a murine C57-BL6/MB-49 transitional cell carcinoma model.

Anticancer Res 2004; 24:2225-2230.

- Hegele² A, Dalpke A, von Knobloch R, Heeg K, Hofmann R, Olbert P.
No pro-apoptotic effect of immunostimulatory DNA (CpG-ODN) on MB-49
transitional cell carcinoma cells in vitro
Eur Urol 2004, 3:211.
- Hegele, A., Dalpke, A., Heeg, K., Barth, P., Varga, Z., Hofmann, R., Olbert, P.
Immunostimulatory CpG Oligonucleotides Reduce Tumor Burden after
Intravesical Administration in an Orthotopic Murine Bladder Cancer Model
TumorBiology 2005, 26: 274-280;
- Hegele A, Hofmann R (Hrsg.).
Bildatlas Zystoskopie. In: Endoskopische Urologie - Atlas und Lehrbuch
Springer-Verlag 2005: p. 31-40;
- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M,
Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S.
A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA.
Nature 2000, 408:740-745.
- Henault M, Lee LN, Evans GF, Zuckerman SH.
The human Burkitt lymphoma cell line Namalwa represents a homogenous
cell system characterized by high levels of Toll-like receptor 9 and activation
by Cpg- oligonucleotides.
J Immunol Methods 2005; 300:93-99.
- Heney NM
Natural history of superficial bladder cancer. Prognostic features and long
term disease course
Urol Clin North Am 1992,19: 429-433;

Hermanek, P. and Sobin, L.H

UICC TNM Classification of malignant tumors

Springer Verlag, 2002

Hosseini J, Golshan AR , Mazloomfard MM, Mehraei AR, Zargar MA, Ayati M,
Shakeri S, Jasemi M, Kabiri M.

Detection of recurrent bladder cancer: NMP22 test or urine cytology?

Urol J. 2012 Winter;9(1):367-72.

Huland H, Friedrich MG

Harnblasenkarzinom

Urologie, Springer Medizin Verlag Heidelberg 2006: 202-212

Hussain I, Kline JN.

CpG oligodeoxynucleotides in asthma.

Curr Opin Investig Drugs 2001; 2:914-918.

Integrated solutions-Real-Time PCR Applications Critical Factors for successful

Real-Time PCR, Qiagen, 01/2004

Iwasaki A., Medzhitov R.

Toll-like receptor control of the adaptive immune responses.

Nat Immunol 2004; 5:987-995.

Jakse G, Algaba F., Fossa S., Stenzl A., Sternber C.

Guidelines on Bladder cancer- Muscle-invasive and Metastatic

European Association of Urology , 2007: p. 2-24

Janeway C, Murphy KP, Travers P, Walport M

Immunobiology, 7.Auflage

Garland Science 2008, Band 978, Ausgaben 0-4129

Jemal A, Murray T, Ward E, et al:

Cancer statistics, 2005.

CA Cancer J Clin 2005;55:10-30;

Jensen K.E., Neal A.L., Owens, R.E., Warren J.

Interferon Responses of Chick Embryo Fibroblasts to Nucleid Acids and
Related Compounds

Nature 200 (1963): 433-434;

Jocham, D., Miller, K. (Hrsg.)

Praxis der Urologie-in zwei Bänden, 3. überarbeitete Auflage (2007),

Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, p.105-166;

Jones SJ, Campbell SC

Non-muscle-invasive bladder cancer (Ta,T1, and CIS)

In: Urology, Campbell-Walsh (editors), El-Sevier 2008, p. 2447-2467

June CH

Adoptive T-cell therapy for cancer in the clinic.

J Clin Invest 2007, 117: 1466-1476

Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, Liu YJ.

Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like
receptors and respond to different microbial antigens.

J Exp Med. 2001 Sep 17;194(6):863-869

Kausch I, Jocham D.

Maligne Tumoren der Harnblase.

In: Praxis der Urologie; Jocham D, Miller K (Hrsg.). Stuttgart-New York:

Georg Thieme Verlag 2007: 63-120.

Kawai T, Akira S:

TLR signalling. Cell Death and Differentiation

(2006) 13, 816–825. doi:10.1038/sj.cdd.4401850, published online

20. January 2006;

Kawarada Y, Ganss R, Garbi N, Sacher T, Arnold B, Hämmerling GJ.

NK- and CD8(+) T cell-mediated eradication of established tumors by peritumoral injection of CpG-containing oligodeoxynucleotides.

J Immunol 2001; 167:5247-5253.

Kienle GS, Kiene H.

Die Coley´sche Fiebertherapie der Krebserkrankung – historischer Markstein oder heute noch Vorbild ?

Der Merkurstab 2003, 56:355-364. ;

Kirkali Z, Chan T, Manoharan M, Algaba F, Busch C, Cheng L, Kiemeny L, von Knobloch R, Brandt H, Schrader AJ, Heidenreich A, Hofmann R

Molecular serological detection of DNA alterations in transitional cell carcinoma is highly sensitive and stage independent.

Clin Cancer Res. 2004 Feb 1;10(3):988-93.

Klinman DM

Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides.

Nat Rev Immunol 2004; 4:249-258

Kranzer K, Bauer M, Lipford GB, Heeg K, Wagner H, Lang R.

CpG-oligodeoxynucleotides enhance T-cell receptor-triggered interferon-gamma production and up-regulation of CD69 via induction of antigen-presenting cell-derived interferon type I and interleukin-12.

Immunology 2000,170-8.

Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM.

CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation.

Nature 1995, 546-9;

Krieg AM

CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects.

Annu Rev Immunol. ; 2002; 20:709-760.

Krieg, AM

Antiinfective Applications of Toll-like Receptor 9 Agonists

Proc Natl Acad Sci USA, Vol.4 (2007): 289-294;

Krieg, AM

CpG still rocks! Update on an accidental drug

Nucleic Acid Ther. 2012 Apr;22(2):77-89. doi: 10.1089/nat.2012.0340.

Kriegmair M, Montironi R, Murphy WM, Sesterhenn IA, Tachibana M, Weider J.

Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis.

Urology 2005, 66:4-34;

Krug A, Towarowski A, Britsch S, Rothenfusser S, Hornung V, Bals R, Giese T, Engemann H, Endres S, Krieg AM, Hartmann G.

Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12.

Eur J Immunol. 2001 Oct;31(10):3026-37.

Kunze D, Wuttig D, Kausch I, Blietz C, Blumhoff L, Burmeister Y, Kraemer K, Fuessel S, Toma M, Schwenzer B, Meye A, grimm MO, Hakenberg OW, Jocham D, Wirth MP

Antisense-mediated inhibition of survivin, hTERT and VGEF in bladder cancer cells in vitro and in vivo
Int J Oncol. 32(5),1049-56; 2008

Lage JM, Bauer WC, Kelley DR et al

Histological parameters and pitfalls in the interpretation of bladder biopsies in bacillus Calmette-Guerin treatment of superficial bladder cancer.
J Urol (1986) 135:916–919

Lamm DL, Steg A, Boccon-Gibod L, Morales A, Hanna MG Jr, Pagano F, Alfthan O, Brosman S, Fisher HA, Jakse G, et al.

Complications of Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy: review of 2602 patients and comparison of chemotherapy complications.
Prog Clin Biol Res 1989; 310:335-355.

Lamm DL, Blumenstein BA, Crissman JD, Montie JE, Gottesman JE, Lowe BA, Sarosdy MF, Bohl RD, Grossman HB, Beck TM, Leimert JT, Crawford ED.

Maintenance bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for recurrent TA, T1 and carcinoma in situ transitional cell carcinoma of the bladder: a randomized Southwest Oncology Group Study.
J Urol 2000; 163:1124-1129.

Lehmann, Retz Stöckle

Blasenkarzinom, Neue Perspektiven in Diagnostik und Behandlung,
Springer, 2005

Leitlinie zur Diagnostik des Blasenkarzinoms-Deutsche Gesellschaft für Urologie

Urologe A, AWMF-Leitlinie Nr. 043/015

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms

Langversion 1.1, 2016, AWMF-Registrierungsnummer 032/038OL,
<http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Harnblasenkarzinom.92.0.html>

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms

Kurzversion 2.0 – März 2020 AWMF-Registernummer: 032/038OL

Leonard JP, Link BK, Emmanouilides C, Gregory SA, Weisdorf D, Andrey J, Hainsworth J, Sparano JA, Tsai DE, Horning S, Krieg AM, Weiner GJ.

Phase I trial of toll-like receptor 9 agonist PF-3512676 with and following rituximab in patients with recurrent indolent and aggressive non Hodgkin's lymphoma.

Clin Cancer Res 2007; 13:6168-6174.

Liang H, Nishioka Y, Reich CF, Pisetsky DS, Lipsky PE.

Activation of human B cells by phosphorothioate oligodeoxynucleotides.

J Clin Invest. 1996 Sep 1,98(5):1119-29

Link BK, Ballas ZK, Weisdorf D, Wooldridge JE, Bossler AD, Shannon M, Rasmussen WL, Krieg AM, Weiner GJ

Oligodeoxynucleotide CpG 7909 delivered as intravenous infusion demonstrates immunologic modulation in patients with previously treated non-Hodgkin lymphoma.

J Immunother (1997) 2006; 29:558-568.

Lipford GB, Bendigs S, Heeg K, Wagner H.

Poly-guanosine motifs costimulate antigen-reactive CD8 T cells while bacterial CpG DNA affect T-cell activation via antigen-presenting cell-derived cytokines.

Immunology 2000,46-52.;

Ljunggren HG, Karre K.

In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition.

Immunol.Today 1990,237-44.

Male, David

Immunologie auf einen Blick

Urban&Fischer Verlag, 2005

Kaasinen E, Wijkström H, Malmström P-U, Hellsten S, Duchek M, Mestad O, Rintala E

Alternating Mitomycin C and BCG Instillations versus BCG Alone in Treatment of Carcinoma in Situ of the Urinary Bladder: A Nordic Study
European Urology 43 (2003) 637–645

Loskog A, Ninalga C, Hedlund T, Alimohammadi M, Malmström PU, Tötterman TH.

Optimization of the MB49 mouse bladder cancer model for adenoviral gene therapy

Lab Anim. 2005 Oct;39(4):384-93.

Malmstrom, P.U., et al.,

An individual patient data meta-analysis of the long-term outcome of randomised studies comparing intravesical mitomycin C versus bacillus Calmette-Guerin for non-muscle-invasive bladder cancer. Eur Urol, 2009. 56(2): p. 247-56.

Manegold C, Leichmann G, Gravenor D, Woytowicz D, Mezger J, Albert G,

Schmalbach T, Al-Adhami M.

Addition of PF-3512676 (CpG 7909) to a Taxane/Paltinum regimen for firstline treatment of unresectable non-small cell lung cancer (NSCLC) improves objective response – Phase II clinical trial.

Eur J Cancer Suppl 2005, 3:326 (A1131).

Mason KA, Neal R, Hunter N, Ariga H, Ang K, Milas L.

CpG oligodeoxynucleotides are potent enhancers of radio- and chemoresponses of murine tumors.

Radiother Oncol 2006; 80:192-198.

Mastini C, Becker PD, Iezzi M, Curcio C, Musiani P, Forni G, Cavallo F, Guzmán CA

Intramammary application of non-methylates-CpG oligodeoxynucleotides (CpG) inhibits both local and systemic mammary carcinogenesis in female BALB/c Her-2/neu transgenic mice

Curr Cancer Drug Targets. 2008 May;8(3):230-42.

McAveney KM, Gomella LG, Lattime EC.

Induction of TH1- and TH2-associated cytokine mRNA in mouse bladder following intravesical growth of the murine bladder tumor MB49 and BCG immunotherapy.

Cancer Immunol Immunother 1994, 39:401-406. ;

Medema JP, Borst J.

T cell signaling: a decision of life and death.

Hum Immunol. 1999 May;60(5):403-11. Review.

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr.

A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity.

Nature. 1997 Jul 24;388(6640):394-7.

Messina, J. P., Gilkeson, G. S. und Pisetsky, D. S.:

Stimulation of in vitro murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA.

J Immunol 1991, 147: 1759-64 ;

Messina, J. P., Gilkeson, G. S. und Pisetsky, D. S.:

The influence of DNA structure on the in vitro stimulation of murine lymphocytes by natural and synthetic polynucleotide antigens.

Cell Immunol 1993, 147: 148-57 ;

Millán-Rodríguez F, Chéchile-Toniolo G, Salvador-Bayarri J, Palou J, Vicente-Rodríguez J.

Multivariate analysis of the prognostic factors of primary superficial bladder cancer.

J Urol. 2000 Jan;163(1):73-8;

Mini Opticon™ System - For Real-Time-PCR Detection;

Operations manual; Supports Opticon Monitot™ Version 3.1;

Catalog numer CFB- 312o

http://www.bio-rad.com/cmc_upload/Literature/185969/Bulletin_10954.pdf

Moch, H.H, PA; Ulbright, TM; Reuter, VE,

WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs in WHO OMS. 2016

International Agency for Research on cancer (IARC):Lyon

Morales A, Eidinger D, Bruce AW.

Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors.

J Urol 1976, 116:180

Moretta L, Bottino C, Pende D, Mingari MC, Biassoni R, Moretta A.

Human natural killer cells: their origin, receptors and function.

Eur.J.Immunol. 2002,1205-11. ;

Mowatt, G., et al.,

Photodynamic diagnosis of bladder cancer compared with white light cystoscopy: Systematic review and meta-analysis.

Int J Technol Asses Health Care, 2011. 27(1):p.3-10.

Murad YM, Clay TM, Lyerly HK, Morse MA.

CPG-7909 (PF-3512676, ProMune): toll-like receptor-9 agonist in cancer therapy.

Expert Opin Biol Ther 2007; 7:1257-1266.

Muraille E,

Revisiting the Th1/Th2 paradigm.

1998 Jan;47(1):1-9.

Murta-Nascimento C, Schmitz-Dräger BJ, Zeegers MP, Steineck G, Kogevinas M, Real FX, Malats N.

Epidemiology of urinary bladder cancer: from tumor development to patient's death.

World J Urol 2007, 25:285-95

Muzio, M, Polentarutti,N., Bosisio,D., Manoj Kumar, P.P., Mantovani,A.,

Toll-like receptor family and signalling pathway

Biochemical Society Transactions, Vol.28 part 5., 2000, p.563-566;

Neumann, J (Hrsg.).

Immunbiologie - Eine Einführung

Springer-Verlag, 2008

O'Flynn JD, Smith JM, Hanon JS

Transurethral resection for the assessment and treatment of vesical neoplasms : a review of 840 consecutive cases.

Eur Urol (1975) 1:38-40;

Olbert P, Dalpke A, von Knobloch R, Heeg K, Hofmann R, Hegele A:

Toll-like receptor expression in MB-49 transitional cell carcinoma cells in culture

Onkologie 2004; 27: 146

Oosterlinck W, Lobel B, Jakse G, Malmström PU, Stöckle M, Sternberg C,

European Association of Urology (EAU) Working Group on Oncological Urology. Guidelines on bladder cancer.

Eur Urol 2002, 41:105-112;

Oosterlinck W., van der Meijden A., Sylvester R., Böhle A., Rintala E., Solsona Narvón E., Lobel A.

Guidelines on TaT1 (non-muscle invasive) bladder cancer.

EAU Guidelines, Pocket 2007, 3-16;

Pagano F, Bassi P, Galetti TP, Meneghini A, Milani C, Artibani W, Garbeglio A.

Results of contemporary radical cystectomy for invasive bladder cancer: a clinicopathological study with an emphasis on the inadequacy of the tumor, nodes and metastases classification.

J Urol. 1991 Jan, 145(1):45-50;

Patni S, Flynn P, Wynen LP, Seager AL, Morgan G, White JO, Thornton CA
An introduction to Toll-like receptors and their possible role in the initiation of labour.

BJOG 2007; 114:1326-1334

Paik ML, Scolieri MJ, Brown SL, Spirnak JP, Resnick MI.

Limitations of computerized tomography in staging invasive bladder cancer before radical cystectomy.

J Urol 2000, 163:1693-1696;

Pearl R.

Cancer and tuberculosis.

Am J Hyg 1929, 9:97-100.

Pedersen G, Andresen L, Matthiessen MW, Rask-Madsen J, Brynskov J.

Expression of Toll-like receptor 9 and response to bacterial CpG oligodeoxynucleotides in human intestinal epithelium.

Clin Exp Immunol 2005; 141:298-306.

¹Pfaffl, M.W.

Quantification strategies in real-time RT-PCR

The real-time PCR Encyclopaedia A-Z of quantitative PCR.

International University Line (Bustin, St. A. ed.),

La Jolla, CA, (2004) S. 87-120

²Pfaffl, M.W.:

Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung

BIOspektrum, Sonderausgabe PCR, 10 (2004) S. 92-95

Platz J, Beisswenger C, Dalpke A, Koczulla R, Pinkenburg O, Vogelmeier C, Bals R.

Microbial DNA induces a host defense reaction of human respiratory epithelial cells.

J Immunol 2004; 173:1219-1223.

Prescott S, James K, Hargreave TB, Chisholm GD, Smyth JF.

Radio-immunoassay detection of interferon-gamma in urine after intravesical Evans BCG therapy.

J Urol 1990; 144:1248-1251

Prescott,S., Jackson, A.M.,Hawkyard, S.J., Alexandroff, A.B., James K.

Mechanisms of Action of Intravesical Bacille Calmette-Guérin: Local Immune Mechanisms

Clin Infect Dis. 2000 Sep,31 Suppl 3:S91-3

Rankin R, Pontarollo R, Ioannou X, Krieg AM, Hecker R, Babiuk LA, van Drunen Littel-van den Hurk S.

CpG motif identification for veterinary and laboratory species demonstrates that sequence recognition is highly conserved.

Antisense Nucleic Acid Drug Dev 2001; 11:333-340.

Ratliff TL, Haaff EO, Catalona WJ.

Interleukin-2 production during intravesical bacille Calmette-Guerin therapy for bladder cancer.

Clin Immunol Immunopathol 1986; 40:375-379.

Ratliff TL, Gillen D, Catalona WJ.

Requirement of a thymus dependent immune response for BCG-mediated antitumor activity.

J Urol 1987, 137:155-158.

Real Time PCR, Applications guide

Bio-Rad Laboratories, Inc. © 2005

Res P, Spits H.

Developmental stages in the human thymus

Semin Immunol. 1999 Feb;11(1):39-46

Robert Koch Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen
Krebsregister in Deutschland e.V.(Hrsg.)

Krebs in Deutschland 2003-2004. Häufigkeiten und Trends

Seite 80-83; Berlin 2008

Robert Koch Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen
Krebsregister in Deutschland e.V.(Hrsg.)

Krebs in Deutschland. 2015

Rock KL, Hearn A, Chen CJ, Shi Y

Natural endogenous adjuvants.

Springer Semin Immunopathol 2005, 26: 231-246

Rödder K, Olianias R, Fisch M.

Harnableitung - was ist möglich?

Wissenschaft und Praxis, hdb 5/08, S. 20 - 23

Rogers PR, Huston G, Swain SL

High antigen density and IL-2 are required for generation of CD4 effectors
secreting Th1 rather than Th0 cytokines.

J Immunol. 1998 Oct 15; 161(8):33844-52

Rübben H

Harnblasenkarzinom – Auftakt zur Artikel-Serie,
Bladder Cancer – a Series of Articles in Deutsches Ärzteblatt,
Dtsch Arztebl 2007; 104(11): A-718 / B-632 / C-608, MEDIZIN: Editorial

Scheller T, Hofmann R, Hegel A

Sex-related differences in urothelial cell carcinoma of the bladder in
Germany.

Cancer Manag Res. 2018 Dec 28;11:309-316. doi:

10.2147/CMAR.S181532. eCollection 2019.

PMID: 30643456

Schillie S, Romero J, Ward J, Nelson N.

Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices
for Use of a Hepatitis B Vaccine with a Novel Adjuvant.

MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2018 Apr 20;67(15):455-458. doi:

10.15585/mmwr.mm6715a5.

Schips L, Augustin H, Zigeuner RE, Gallé G, Habermann H, Trummer H,
Pummer K, Hubner G.

Is repeated transurethral resection justified in patients with newly
diagnosed superficial bladder cancer?

Urology 2002, 59:220-223;

Schmitt E, Germann T, Goedert S, Hoehn P, Huels C, Koelsch S, Kühn R, Müller
W, Palm N, Rüde E.

IL-9 production of naive CD4+ T cells depends on IL-2, is synergistically
enhanced by a combination of TGF-beta and IL-4, and is inhibited by IFN-
gamma.

J Immunol. 1994 Nov 1;153(9):3989-96.

Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, Antonenko S, Liu YJ

The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood.
Science. 1999 Jun 11;284(5421):1835-7.

Seder RA, Boulay JL, Finkelman F, Barbier S, Ben-Sasson SZ, Le Grps G, Paul WE

CD8+ T cells can be primed in vitro to produce IL-4.
J Immunol. 1992 Mar 15;148(6):1652-6.

Shephard, E.A., et al.,
Clinical features of bladder cancer in primary care.
Br J Gen Pract 2012.62 (602):p e598-604

Shirota H, Klinman DM
Recent progress concerning CpG DNA and its use as a vaccine adjuvant.
Expert Rev Vaccines. 2014 Feb;13(2):299-312. doi:
10.1586/14760584.2014.863715. Epub 2013 Nov 26.

Sobin L, Gospodarowicz M, Wittekind C
TNM Classification of Malignant Tumours
Seventh Edition, UICC (global cancer control), 2009

Sparwasser, T., Miethke, T. und Lipford, G. B.
Macrophages Sense Pathogens via DNA Motifs: Induction of Tumor
Necrosis Factor- Alpha-Mediated Shock
Eur. J. Immunol. 27 (1997) 1671-1679

Suttman H, Riemensberger J, Bentien G, Schmaltz D, Stöckle M, Jocham D, Böhle A, Brandau S.

Neutrophil granulocytes are required for effective Bacillus Calmette-Guérin immunotherapy of bladder cancer and orchestrate local immune responses.

Cancer Res 2006, 66:8250-8257

Sternberg CN, Yagoda A, Scher HI, Watson RC, Ahmed T, Weiselberg LR, Geller N, Hollander PS, Herr HW, Sogani PC, et al.

Preliminary results of M-VAC (methotrexate, vinblastine, doxorubicin and cisplatin) for transitional cell carcinoma of the urothelium.

J Urol 1985; 133:403-437.

Sylvester RJ, van der Meijden AP, Oosterlinck W, Witjes JA, Bouffieux C, Denis L, Newling DW, Kurth K.

Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials

Eur Urol 2006, 49:466-475;

Sylvester RJ, Oosterlinck W, van der Meijden AP.

A single immediate postoperative instillation of chemotherapy decreases the risk of recurrence in patients with stage Ta T1 bladder cancer: a meta-analysis of published results of randomized clinical trials.

J Urol. 2004 Jun, 171(6 Pt 1):2186-90;

Sylvester RJ, van der Meijden AP, Lamm DL.

Intravesical bacillus Calmette-Guerin reduces the risk of progression in patients with superficial bladder cancer: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials.

J Urol 2002, 168:1964-1970;

Thalmann GN, Sermier A, Rentsch C, Möhrle K, Cecchini MG, Studer UE.

Urinary Interleukin-8 and 18 predict the response of superficial bladder cancer to intravesical therapy with bacillus Calmette-Guerin.

J Urol 2000; 164:2129-2133.

Tokunaga T, Yamamoto H, Shimada S, Abe H, Fukuda T, Fujisawa Y, Furutani Y, Yano O, Kataoka T, Sudo T,

Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from Mycobacterium bovis BCG. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity.

J.Natl.Cancer Inst. 1984, 955-62;

Tokunaga T, Yano O, Kuramoto E, Kimura Y, Yamamoto T, Kataoka T, Yamamoto S.

Synthetic Oligonucleotids with particular Base Sequences from cDNA Encoding Proteins of Mycobacterium bovis BCG Induce Interferons and Activate Natural Killer Cells

Microbiol Immunol. 1992,36(1):55-66

Ulevitch RJ

Therapeutics targeting the innate immune system.

Nat Rev Immunol 2004; 4:512-520

Ursu R, Carpentier A, Metellus P, Lubrano V, Laigle-Donadey F, Capelle L, Guyotat J, Langlois O, Bauchet L, Desseaux K, Tibi A, Chinot O, Lambert J, Carpentier AF

Intracerebral injection of CpG oligonucleotide for patients with de novo glioblastoma—A phase II multicentric, randomised study

Eur J Cancer. 2017 Mar;73:30-37. doi: 10.1016/j.ejca.2016.12.003. Epub 2017 Jan 28.

Verthelyi D, Ishii KJ, Gursel M, Takeshita F, Klinman DM

Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CPG motifs

J Immunol 2001; 166: 2372-2377.

Wang H, Rayburn E, Zhang R.

Synthetic oligodeoxynucleotides containing deoxycytidyl-deoxyguanosine dinucleotides (CpG ODNs) and modified analogs as novel anticancer therapeutics.

Curr Pharm Des 2005; 11:2889-2907.

Wijkstrom H, Lagerkvist M, Nilsson B, et al:

Evaluation of clinical staging before cystectomy in transitional cell bladder carcinoma: A long-term follow-up of 276 consecutive patients.

Br J Urol 1998;81:686-691;

Witjes JA, Hendricksen K.

Intravesical Pharmacotherapy for Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer: A Critical Analysis of Currently Available Drugs, Treatment Schedules, and Long-Term Results.

Eur Urol. 2008, 53:45-52;

Wooldridge JE, Weiner GJ.

CpG DNA and cancer immunotherapy: orchestrating the antitumor immune response.

Curr Opin Oncol 2003; 15:440-445.

Yamamoto S, Yamamoto T, Shimada S, Kuramoto E, Yano O, Kataoka T, Tokunaga,T.

DNA from Bacteria but not from vertebrates, induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth

Microbiol. Immunol. 36 (9)(1992) 983-997

- Yamamoto S, Yamamoto T, Kataoka T, Kuramoto E, Yano O, Tokunaga T.
Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce IFN [correction of INF] and augment IFN-mediated [correction of INF] natural killer activity.
J Immunol. 1992 Jun 15;148(12):4072-6
- Yamamoto S, Kuramoto E, Shimada S, Tokunaga T 1988.
In vitro augmentation of natural killer cell activity and production of interferon- alpha/beta and -gamma with deoxyribonucleic acid fraction from Mycobacterium bovis BCG.
Jpn J Cancer Res 1998; 79:866-873.
- Yi AK, Chace JH, Cowdery JS, Krieg AM.
IFN-gamma promotes IL-6 and IgM secretion in response to CpG motifs in bacterial DNA and oligodeoxynucleotides.
J.Immunol. 1996,558-64.
- Yi AK, Chang M, Peckham DW, Krieg AM, Ashman RF.
CpG oligodeoxyribonucleotides rescue mature spleen B cells from spontaneous apoptosis and promote cell cycle entry.
J.Immunol. 1998,5898-906.
- Yi AK, Peckham DW, Ashman RF, Krieg AM.
CpG DNA rescues B cells from apoptosis by activating NFkappaB and preventing mitochondrial membrane potential disruption via a chloroquine-sensitive pathway.
Int.Immunol. 1999,2015-24.
- Zaak D, Weiss M
Harnblasenkarzinom: Epidemiologie, Ätiologie, Pathogenese, Histologie, Stadieneinteilung, Symptomatik und Diagnostik
Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München, 2003

Zeegers MP, Kellen E, Buntinx F, van den Brandt PA.

The association between smoking, beverage consumption, diet and bladder cancer: a systematic literature review.

World J Urol 2004; 21:392-401.

Zimmermann S., Egeter O., Hausmann S., Lipford GB., Rocken M., Wagner H., Heeg K.

CpG oligodeoxynukleotides trigger protective and curativeTh1 responses in lethal murine leishmaniasis

J Immunol 1998, 160:3627-3630.

Zhang D, Zhang G, Hayden MS, Greenblatt MB, Bussey C, Flavell RA, Ghosh S.

A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria.

Science 2004, 303:1522-1526.

8 Anhang

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer während meines Studiums an der Philipps-Universität Marburg waren die Damen/Herren:

In Marburg:

Adamkiewicz, Alfke, Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Becker, Boudriot, Cetin, Christiansen, Czubayko, Daut, Eilers, Feuser, Gerdes, Gotzen, Griss, Grzeschik, Gudermann, Grundmann, Herrmann-Lingen, Hasilik, Hertl, Hofmann, Jungclas, Kann, Kill, Klenk, Klose, Koch, Koolmann, Krieg, Kroll, Kunz, Lang, Lenz, Lill, Löffler, Lohoff, Lorenz, Maier, Mandrek, Max, Moll, Moosdorf, Mueller, Müller, Mutters, Neubauer, Oertel, Radsak, Remschmidt, Renz, Richter, Rieder, Röhm, Röper, Rothmund, Schäfer, Schrader, Seitz, Seyberth, Voigt, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Westphal, Wulf

In Gießen:

Schneider, Weiler

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Axel Hegele als auch PD Dr. Jochen Olbert für die langjährige, unterstützende Betreuung und die Einführung in die Welt der Labormedizin ergänzend zu Ihrem Arbeitsalltag.

Frau Nottelmann und Frau Heidrun Brandt danke ich für das Lehren und die stetig geduldige Hilfe bei den laborexperimentellen Techniken.

Ohne meine treue „PCR-Partnerin“ und Freundin Corinna Nora Keil, mit der Wochenenden vor den Maschinen zum „Ereignis“ wurden, wäre diese Arbeit nicht denkbar gewesen.

Herrn Timo Paulsen danke ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung im Zahlendschungel.

Meiner Mutter, Elfriede Scholl, sowie meinem Bruder, Hendrik Scholl, bin ich für die stetige Motivation und Unterstützung dankbar, sowie meinen beiden Traumfreundinnen Julia Elisabeth Krämer und Lena Nell für offene Ohren und Blicke via Skype, unterstützende Post, Telefonate und graphische Verschönerungen.

Der größte Dank gilt meinem Ehemann Nawid Salimi für seine fachlich, liebevoll, strategisch, kürzenden Korrekturen und den letzten Formatierungsschliff dieser jahrelang gereiften Arbeit.